

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
GENEETIKA ÕPPETOOL

Tanel Ilmjärv

*Pseudomonas putida* mutatsiooniprotsesside sõltuvus  
kromosomaalsest lokaliseerimisest ja rakkudevahelisest  
kommunikatsioonist

Magistritöö

Juhendajad: Ph.D. Maia Kivisaar

Ph.D. Heili Ilves

TARTU 2013



# Sisukord

Sisukord .....	2
Kasutatud lühendid .....	5
Sissejuhatus .....	7
1. Kirjanduse ülevaade .....	8
1.1. Bakterite elutsükkel.....	8
1.1.1. Statsionaarne faas.....	9
1.1.1.1. RpoS.....	9
1.1.1.2. Globaalsed regulaatorid .....	10
1.1.1.3. sRNA-d ja nende roll geeniekspressiooni kontrollis .....	10
1.1.1.4. Stringent response .....	11
1.2. Bakteritevaheline suhtlus .....	11
1.2.1. Kontaktsõltuvad signaalmehhanismid .....	12
1.2.2. Kvooruntunnetus.....	12
1.2.2.1. Atsüül-homoseriin laktoon.....	13
1.2.2.2. Alküül-kinoloonid .....	14
1.2.2.3. Autoinduktor 2 .....	15
1.3. Bakterite evolutsioneerumine stressitingimustes .....	15
1.3.1. Statsionaarse faasi mutageneesi molekulaarsed mehhanismid .....	16
1.3.2. Mutatsioonisagedust mõjutavad tegurid bakteri kromosoomis .....	18
2. Eksperimentaalosa .....	20
2.1. Töö eesmärk .....	20
2.2. Materjal ja metoodika .....	21
2.2.1. Söötmel, bakteritüved ja plasmiidid.....	21
2.2.2. PCR.....	22
2.2.3. Geelelektroforees .....	25

2.2.4. Bakterite elektroporatsioon.....	25
2.2.5. Bakterite konjugatsioon .....	25
2.2.6. Plasmiidse DNA eraldamine „Axygen“ kitiga ja restriksioonanalüüs .....	26
2.2.7. Phe <sup>+</sup> mutantide akumulatsioonikatse .....	26
2.2.8. <i>P. putida</i> nälgiva populatsiooni elumuse määramine .....	26
2.2.9. Sekveneerimine .....	27
2.2.10. Inhibitsioonikatse .....	27
2.2.11. Transposoonmutagenees ja ARB-PCR (Arbitrary-PCR) .....	28
2.2.12. Kolooniate eemaldamise katse .....	29
2.2.13. Soovitud geeni deletsiooniga <i>P. putida</i> tüvede konstrueerimine .....	29
2.2.14. Phe <sup>+</sup> mutatsioonide tuvastamine .....	31
2.2.15. Mutatsioonispektri analüüs kasutades Monte Carlo meetodit .....	31
2.2.16. Mutatsioonisageduste võrdlus kasutades ANOVA statistilise analüüsi meetodit ja „Tukey“ testi .....	32
3. Tulemused .....	33
3.1. Mutatsioonispektri iseloomustamine <i>P. putida</i> kromosoomi erinevates piirkondades. ....	33
3.2. Statsionaarses faasis ja kasvavas kultuuris tekkinud Phe <sup>+</sup> mutatsioonide võrdlus. ....	36
3.3. Statsionaarse faasi mutantide akumulatsiooni pärssivad mehhanismid .....	37
3.4. Taustarakkude inhibeeriva mõju uurimine Phe <sup>+</sup> kolooniate kasvule.....	40
3.5. Inhibitsiooni tekitavate geenide tuvastamine.....	41
3.6. PP_4173 deletsiooni mõju Phe <sup>+</sup> mutantide tekkele .....	43
4. Arutelu .....	44
4.1 Enim tuvastatud mutatsioonide võimalikud põhjused .....	44
4.2. Transposooni <i>IS1411</i> insertisoonisageduse varieeruvus piirkonniti.....	45
4.3. Statsionaarse faasi akumulatsioon .....	46
Kokkuvõte.....	50
Summary .....	52

Kasutatud kirjandus: .....	54
Kasutatud veebiaadressid .....	59
Lisamaterjalid.....	60
Lisa 1. Phe <sup>+</sup> mutantides lacI geenis ja operaatoralas tekkinud mutatsioonide spekter erinevates phe- lacI tüvedes .....	60
Lisa 2. Sekveneeritud <i>lacI-P<sub>lac</sub>pheBA</i> testsüsteemi abil tuvastatud Phe <sup>+</sup> mutatsioonide paariviisilised võrdlused ja saadud <i>P</i> -väärtused .....	63
Lisa 3. Erinevatel päevadel selektiivsöötmele ilmunud Phe <sup>+</sup> kolooniate mutatsioonispektrid .....	64
Lisa 4. Erinevatel päevadel selektiivsöötmele ilmunud Phe <sup>+</sup> kolooniates tekkinud mutatsioonide spektrite võrdlus .....	67
Lisa 5. Mutatsioonispektrite võrdlus päevade lõikes .....	68
Lisa 6. Mutatsioonisageduste paarisviisiline võrdlus erinevate päevade lõikes .....	68
Lisa 7. Phe <sup>+</sup> kolooniate akumulatsioon fenool-minimaaltsassidel.....	71
Lisa 8. Publikatsioon.....	71

## Kasutatud lühendid

AHL – atsüül-homoseriin laktoon

AI – autoinduktor molekulid

AI2 – autoinduktor 2

AMD – amplifikatsioonist sõltuv mutatsioon

ANOVA – dispersioonanalüüs (*Analysis of Variance*)

AQ – 2-allüül-4(1H)-kinoloon

CAA – *Casamino Acids*

Cb – karbenitsilliin

CDI – kontaktsõltuv inhibitsioon

CFU – kolooniaid moodustavate rakkude arv (*Colony Forming Units*)

DNAP – DNA polümeraas

dNTP – tähistab nelja desoksüribonukleotiidi: dATP, dGTP, dCTP ja dTTP

dsDNA – kaheaheelaline DNA (*double-stranded DNA*)

EDTA – etüleen-diamiin-tetra atsetaat (*ethylene diamino tetraacetic acid*)

Glc – glükoos

Km – kanamütsiin

KS – kontaktsõltuvad signaalmehhanismid

LB – Lüsogeenne sööde

LF – *lag* faas

Lrp – leutsiin-sõltuv regulaatorvalk

MMR – DNA valepaardumiste reparatsioon (*Mismatch Repair*)

mRNA – *messenger* RNA

NAP – nukleoid-seonduvad valgud (*Nucleoid-Associated Proteins*)

NER – nukleotiidi väljalõike reparatsioon (*Nucleotide Excision Repair*)

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (*Polymerase Chain Reaction*)

Phe – fenool

Pol – polümeraas

ppGpp – guanosiiintetrafosfaat

PQS – *Pseudomonas*-e kinlooni signaal

QS – kvoorumtunnetus (*Quorum Sensing*)

Rif – rifampitsiin

RMD – homoloogilisest rekombinatsioonist sõltuv mutagenees

RNAP – RNA polümeraas

ROS – reaktiivsed hapniku ühendid

SAP – kreveti aluseline fosfataas (*Shrimp Alkaline Phosphatase*)

SF – statsionaarne faas

Sm – streptomütsiin

SR – *Stringent Response* (poomisvastus)

sRNA – väike RNA

ssDNA – üheaheelaline DNA (*single-stranded DNA*)

Tel – telluriit

Tet – tetratsükliin

Tn – transposoonmutant

UV-kiirgus – ultraviolettkiirgus

# Sissejuhatus

Mikroorganismide muutlik elukeskkond on kaasa toonud vajaduse mitmete kohanemisprotsesside kujunemiseks. Ebasobivad kasvutingimused põhjustavad stressi ja suunavad bakterid statsionaarsesse faasi. Statsionarses faasis akumulatuurvad bakterite genoomis mutatsioonid, millest mõned võimaldavad bakteritel paremini kohastuda antud keskkonnaga. Sellist protsessi nimetatakse statsionaarse faasi mutageneesiks. Tänu tehnoloogia arengule ja DNA sekveneerimise kättesaadavuse tõusule leidub üha enam informatsiooni bakterite kromosoomis toimuvatest muutustest. Kromosomaalseid muutusi on varem uuritud nii *in vivo* kui *in silico* katsetes ja tulemused on olnud vastuolulised (Sharp jt, 1989; Mira ja Ochman, 2002). Genoomide sekveneerimisel on leitud seos mutatsioonide tekke ja kaugusega *oriC* järjestusest, kuid testsüsteemide inserteerimiskatsetega sellist seost ei ole kirjeldatud (Hudson jt, 2002). Kuigi enamus katsetest on viidud läbi *Escherichia coli* tüvedega, uuritakse mutatsiooniprotsesse ka teistes liikides nagu näiteks meie laboris kasutatavas *Pseudomonas putida*-s.

Kuna evolutsioneerumise aluseks on mutatsioonide akumulatuurumine, siis nende tekkeprotsesside täpsem mõistmine võimaldab sekkuda mikroorganismide adapteerumisega seotud probleemidesse. Mutatsiooniprotsesside uurimiseks on meie laboris konstrueeritud mitmeid testsüsteeme, mis võimaldavad tuvastada mutatsioone, mille tagajärjel suudavad bakterid kasutada süsinikuallikana fenooli.

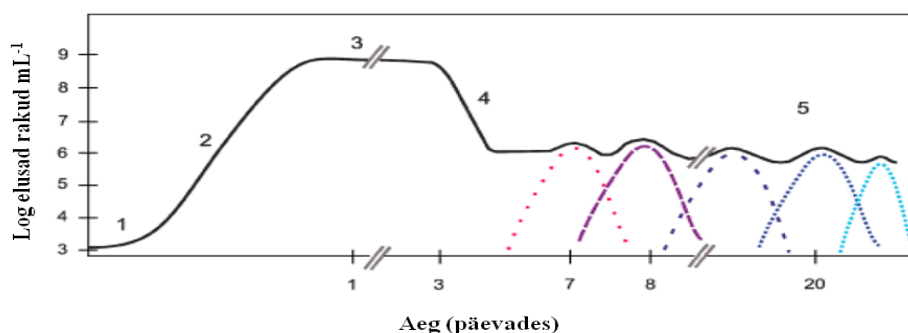
Käesoleva töö eesmärgiks on uurida mutatsioonide tekke dünaamikat kromosoomi erinevates piirkondades ja mutantide akumulatsioonini pärssivaid mehhanisme statsionaarse faasi rakkude populatsioonis.



# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1. Bakterite elutsükkel

Mikroorganismide, sealhulgas bakterite, elutegevus sõltub suuresti keskkonnast ja eriti just toitainete hulgast. Muutused keskkonnas mõjutavad bakterite kasvukiirust. Gram negatiivsetel bakteritel, kuhu kuuluvad näiteks *Escherichia coli* ja ka meie laboris uuritud *Pseudomonas putida*, esineb viis kasvufaasi (vt. joonis 1). Uude soodsasse keskkonda sattudes on bakterid alguses *lag* faasis (LF), kus nad tajuvad uute toitainete ilmumist ning neis leiab aset rida muutusi, et saaks hakata toimuma replikatsioon ja rakkude jagunemine. Antud faasi pikkus ja seal toimuvate rakujagunemiste aeg sõltub varem statsionaarses faasis veedetud aja pikkusest (Pin ja Baranyi, 2008). Muutustega kohanenuna suudavad rakud soodsas keskkonnas saavutada suurima võimaliku kasvukiiruse ning seda kasvufaasi nimetatakse eksponentsiaalseks faasiks. Rakkude kiire kasv toimub senikaua, kuni toitaineid jagub. Toitainete vähenemine ja muud stressisignaalid suunavad rakud statsionaarsesse faasi (SF) (Navarro Llorens jt, 2010), kus rakujagunemist enam ei toimu ja rakud valmistuvad toimetulekuks erinevate stressiteguritega (Lacour ja Landini, 2004). SF rakukultuur on tegelikult väga heterogeenne (Huisman jt, 1996). Pikemat aega nälgivad rakud hakkavad vedelkultuuris kaotama oma eluvõimet ja surema. Ellu jäänud rakud kasutavad surnud rakkudest vabanenud aminohappeid, lipiide ja DNA-d kasvuks (Finkel, 2006). Surma faasile järgneb pikaajaline statsionaarne faas, kus toimub balansseeritult rakkude jagunemine ja surm, kusjuures üldine rakkude arvukus populatsioonis ei muutu. Sel viisil suudavad bakterid elada kuid või isegi aastaid (Navarro Llorens jt, 2010).



Joonis 1. Bakterite kasvufaasid *E. coli* näitel. Rakke on kasvatatud aeroobsetes tingimustes rikkas söötmes temperatuuril 37°C. Eristatud on 5 faasi: 1) lag faas; 2) eksponentsiaalne faas; 3) statsionaarne faas; 4) surma faas ja 5) pikaajaline statsionaarne faas. Modifitseeritud joonise algversioon: (Navarro Llorens jt, 2010).

Eelpoolkirjeldatud 5 faasi on defineeritud laboris läbiviidud katsete põhjal *E. coli* rakukultuuriga ja ei pruugi olla ülekantavad looduses toimuvale. Kuna looduslikes

tingimustes veedavad bakterid üldjuhul suurema osa oma elust toitainevaeses keskkonnas, siis on rakud valdavalt kas statsionaarses või pikaajalises statsionaarses faasis. Levinud arusaama kohaselt koosneb hinnanguliselt umbes 60% maa biomassist niiöelda puhkavatest (ingl. k. *resting*) mikroorganismidest (Gray jt, 2004) ning seetõttu käsitlen järgnevalt põhjalikumalt SF-i sisenemist ja seal toimuvaid muutusi.

### **1.1.1. Statsionaarne faas**

Statsionaarsesse faasi sisenedes toimub bakterirakkudes mitmeid morfoloogilisi ja füsioloogilisi muutusi. Rakkude suurus väheneb kahel põhjusel. SF-i jõudes viiakse lõpuni pooleli olev DNA replikatsioon ja rakud jagunevad seni, kuni igas rakus on üks kromosoomi koopia. Sel ajal enam uut kromosoomi replikatsiooni ei alustata ja rakud ei suurene. Rakud muutuvad ümaramaks ning sellega kaasneb raku eripinna suurenemine. Rakkude nälgimine viib veelgi väiksemate rakkude tekkele (ingl. k. *dwarfing*). Rakkude ruumala väheneb endogeense materjali (peamiselt rakumembraan ja tsütoplasmaatiline membraan) degradatsiooni tagajärjel (Nystrom, 2004).

SF-i rakkude teiseks olulisemaks muutuseks on üldine stressivastus, kus suureneb molekulaarsete shaperonide hulk, mille tagajärjel taluvad bakterid paremini erinevaid ebasoodsaid keskkonnatingimusi nagu näiteks liiga kõrge temperatuur, pH muutused, kokkupuude antibiootikumidega.

SF-i sisenemine ja eelnevalt kirjeldatud muutuste toimumine on komplekselt reguleeritud, kus rolli omavad mitmed globaalsed regulaatorid. Geene, mis indutseeritakse SF-i sisenemisel, on ligikaudu 200 ja nende avaldumist kontrollivad nii SF-i sigma faktor RpoS, mitmed globaalsed transkriptsiooni regulaatorid, sRNA-d, proteaasid kui ka SR (*stringent response*) (Tani jt, 2002). Kõik eelpool mainitud mehhanismid toimivad ühtse süsteemina, mis võimaldab rakul stressitingimustega paremini toime tulla.

#### **1.1.1.1. RpoS**

SF-i sisenemisel omab suurt tähtsust *rpoS* geeni poolt kodeeritud sigma faktor RpoS ( $\sigma^S$ ), mis on üheks olulisemaks lüliks üldise stressivastuse kujundamisel (Lacour ja Landini, 2004). Sigma faktor on RNA polümeraasi subühik, mis võimaldab RNA polümeraasil spetsiifiliselt promootorile seonduda. Erinevad sigma faktorid tunnevad ära erinevaid promootoreid. Näiteks *E. coli*-l on leitud kuus erinevat sigma faktorit. Erinevate sigma faktorite hulk bakteris sõltub raku füsioloogilisest seisundist ja tajutavatest signaalidest.

RpoS-i hulka rakus kontrollitakse mitme mehhanismi abil. RpoS mRNA moodustab juuksenõelastruktuure, mis takistavad translatsiooni toimumist. *rpoS* mRNA transleeritavaks muutmisel on oluline roll sRNA-del (vt. Kirjanduse ülevaade, peatükk 1.1.1.3). Lisaks sRNA-dele on RpoS-i tase rakus kontrollitud veel kolmekomponentse signaalsüsteemi ArcB/ArcA/RssB kaudu, mis tajub hingamisahelast tulevaid signaale. Põhimõtteliselt toimib süsteem järgmiselt: kui ArcB tajub hingamisahelas kõrget energiataset, siis inhibeeritakse *rpoS* geeni transkriptsioon ja aktiveeritakse RpoS-i proteolüüs. Madala energiataseme tajumisel toimib süsteem vastupidiselt (Hengge, 2008). *E. coli*-s on RpoS-i otsese kontrolli all on üle 70 geeni ning kaudselt mõjutatud ligikaudu 500 geeni (Battesti jt, 2011), mis kaitsevad rakke erinevate stresside puhul nagu UV-kiirgus, oksüdatiivne stress, kuumašokk, hüperosmolaarsus, happeline pH, etanool ja kõrge rõhk (Gruber ja Gross, 2003; Vanlint jt, 2013).

Seondumaks RNA polümeraasiga, peab RpoS konkureerima teiste sigma faktoritega. Stressi süvenedes kasvab rakus RpoS-i hulk võrreldes teiste sigma faktoritega ning see soodustab RpoS-i seondumist RNAP holoensüümiga (Battesti jt, 2011).

#### **1.1.1.2. Globaalsed regulaatorid**

Lisaks sigma faktoritele osaleb globaalses geeniregulatsioonis erinevaid regulaatorvalke, mis mõjutavad kindlate geenide ekspressioonitaset, seondudes spetsiifiliselt nende promootoritele. Näiteks leutsiin-sõltuv regulaatorvalk Lrp võib olla nii transkriptsiooni aktivaator kui ka repressor. Tema ekspressioonitase on pöördvõrdelises seoses rakkude kasvukiirusega. *E. coli* puhul on näidatud Lrp-i mõju enam kui 400-le geenile, millest osa alluvad ka RpoS-i poolsele regulatsioonile. Lrp ülesandeks on rakku ümber programmeerida vastusena toitainete puudusele, kõrgele orgaaniliste hapete kontsentratsioonile ja osmootsele stressile (Tani jt, 2002). Lrp hulk rakus on kontrollitud guanosiin tetrafosfaadi (ppGpp) tasemega, mis on signaaliks toitainete vaegusele, oksüdatiivsele stressile ja DNA kahjustustele. Nende stresside tõttu on ppGpp kontsentratsioon rakus tõusnud, tuues kaasa suurenenud Lrp ekspressioonitaseme (Landgraf jt, 1996).

#### **1.1.1.3. sRNA-d ja nende roll geeniekspressiooni kontrollis**

SF-is toimuvaid muutusi on võimalik kontrollida ka väikeste mittekodeerivate RNA-de (sRNA) kaudu. sRNA-d reguleerivad geeniekspressiooni transkriptsiooni järgselt, mõjutades mRNA-de stabiilsust ja transleeritavust. Selleks peavad nad olema komplementaarsed vastava mRNA järjestusega. Enamus sRNA-sid on umbes 100 nukleotiidi pikkused, nende ekspressioon on täpselt reguleeritud ja sageli seotud stressiga nagu näiteks

Fe<sup>2+</sup> limitatsioon, oksüdatiivne stress, madal temperatuur ja ka glükoosfosfaadi suurenenud kogus rakus (Gottesman, 2005). Efekti saavutamiseks peavad sRNA-d sageli olema seotud RNA chaperoni Hfq-ga. Hfq on heksameerne ringi kujuline valk, mille ülesandeks on sRNA-d stabiliseerida ja soodustada selle seondumist sihtmärk-mRNA-ga (Updegrave ja Wartell, 2011). Täpne mehhanism, kuidas Hfq aitab sihtmärk-RNA-ga seonduda, pole siiani lõplikult selge (Soper jt, 2010).

Mittekodeerivate RNA-de abil on kontrollitud lisaks paljude teiste valkude ekspressioonile ka RpoS. Leitud on kolm RpoS-i translatsiooni aktiveerivat sRNA-d (DsrA, RprA ja ArcZ), mis tunnevad ära ja kinnituvad *rpoS* mRNA-le. Järgneb translatsiooni inhibeeriva sekundaarstruktuuri avamine, mis võimaldab RpoS-i sünteesi (Repoila ja Gottesman, 2001; Carter jt, 2012). Antud näite puhul väärib märkimist asjaolu, et need sRNA-d mõjutavad RpoS valgu translatsiooni sama mehhanismiga, kuid erinevate signaalsüsteemide kaudu, tekitades rakus üldise stressivastuse. Väikestel RNA-del on seega üldises geeniregulatsioonis oluline roll, kuna nad osalevad enamike stressivastuste regulatsioonis (Gottesman, 2005).

#### 1.1.1.4. Stringent response

Rakud reageerivad aminohapete limitatsioonile rea muutustega, kuhu kuulub ka *stringent response* (SR) e. „poomisvastus”. SR tulemusena sünteesitakse guansiintetrafosfaati (ppGpp), mis seondub RNA polümeraasiga ja pärsib paljude geenide (sealhulgas rRNA geenide) transkriptsiooni. ppGpp süntees annab märku toitainete puudusest tingitud kasvu pidurdumisest (Magnusson jt, 2005). *E. coli*-s on ppGpp sünteesiks kaks ensüümi: aminohapete limitatsiooni korral sünteesib seda RelA (Gentry ja Cashel, 1996) ning ppGpp süntees SpoT abil aktiveeritakse siis, kui ilmneb süsiniku, fosfori, raua, lipiidide või aminohapete vaegus. SR vähendab nii DNA replikatsiooni kui ka valgusünteesi, samal ajal soodustades stressivalkude ja aminohapete biosünteesi läbiviivate ensüümide geenide transkriptsiooni (Boutte ja Crosson, 2013).

## 1.2. Bakteritevaheline suhtlus

Omavahelist suhtlemist on uuritud peamiselt hulkraksetel organismidel, kuid üha enam on kirjeldatud kommunikeerumist ka mikroorganismide seas. Bakterid elavad väga muutlikes keskkonnatingimustes ning paremaks toimetulekuks on neil välja kujunenud mitmed mehhanismid üksteise mõjutamiseks. Suhtlusviisid jagunevad peamiselt kahte suuremasse rühma - kvoorumtunnetus (QS) ja kontaktsõltuvad signaalmehhanismid (KS). QS

hõlmab endas populatsiooni mõjutamist signaalmolekulide sekretsiooniga keskkonda. KS toimib vahetult üksteisega kontaktis olevate bakterite puhul. Järgnevalt on toodud põhjalikum ülevaade kummaski süsteemist.

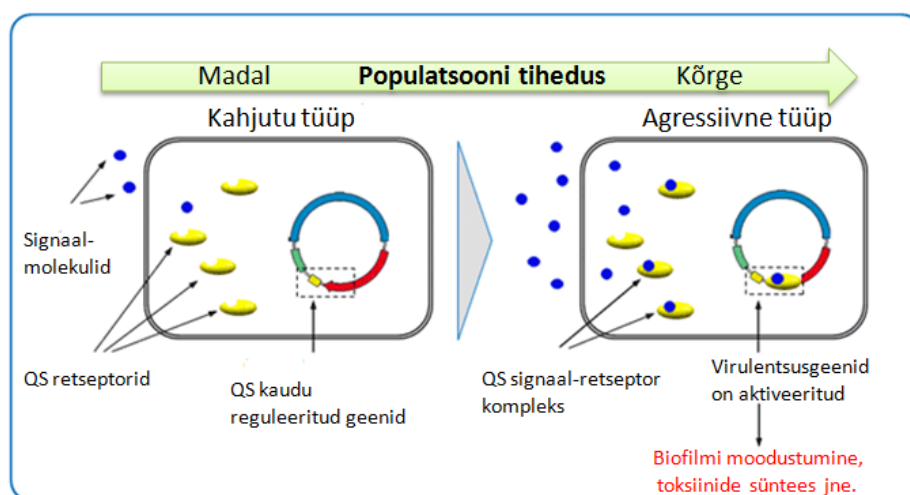
### 1.2.1. Kontaktsõltuvad signaalmehhanismid

Kontaktsõltuvad signaalmehhanismid on üldlevinud signaaliülekanne viisid lähestikku asuvate bakterite vahel nagu näiteks biofilmis. KS-e kasutatakse peamiselt liigisiseseks või liikide vaheliseks konkureerimiseks ja enamuse neist toimivad läbi efektorvalkude sekretsiooni sihtmärkrakku. Bakterite sekretsioonisüsteemid (SS) on jagatud seitsmesse gruppi T1SS-T7SS, millest T5SS võimaldab bakteritel üksteist kontaktsõltuvalt mõjutada (Hayes jt, 2010). Esimesena avastati kontaktsõltuv inhibitsioon (CDI- *contact-dependent inhibition*) 2005. aastal *E. coli* tüvel EC93, mis suutis teiste tüvede kasvu inhibeerida (Slechts ja Mulvey, 2006). CDI-s osaleb *cdiBAI* geeniklaster, kuhu kuuluvad geenid *cdiA* ja *cdiB* kodeerivad kahest valgust koosnevat T5SS-i. Rakkudevahelise kontakti tulemusena seondub CdiA sihtmärk-raku retseptoritele BamA ja tema C-terminaalsest otsast vabaneb toksiini domeen. Kuigi BamA tüüpi retseptoreid on leitud enamikel Gram-negatiivsetel bakteritel, on nende ekstratsellulaarsed osad erinevatel liikidel väga varieeruvad. EC93 tüvel on seega võimalik inhibeerida vaid fülogeneetiliselt lähedaste liikide kasvu. Inhibitsiooni põhjustavasse geeniklastrisse kuulub ka *cdiI* geen, mis kodeerib immuunsusvalku, et hoida ära CDI<sup>+</sup> tüve autoinhibitsiooni. Kirjeldatud mehhanism annab CDI<sup>+</sup> tüvedele eelise inhibeerivat fenotüüpi mitte omavate *E. coli* tüvede ees (Ruhe jt, 2013). Bioinformaatilise analüüsi tulemusena on tuvastatud veel mitmeid funktsionaalseid CDI süsteeme paljude Gram-negatiivsete bakterite genoomidest, kuid *cdiBAI* homolooge on leitud vähestel (Aoki jt, 2010).

### 1.2.2. Kvoorumtunnetus

Rakkude omavahelist suhtlemist autoinduktorite (AI) abil nimetatakse kvoorumtunnetuseks (*quorum sensing* - QS) e. hulgatunnetuseks. AI molekulid akumulerevad keskkonnas ja võimaldavad tajuda rakukultuuri tihedust, liigilist kooslust ning teisi keskkonnast pärinevaid signaale (Bejerano-Sagie ja Xavier, 2007). Antud mehhanism võimaldab koordineerida rakupopulatsioonis geeniekspressiooni, indutseerides sel viisil näiteks virulentsusfaktorite sünteesi, sporulatsiooni, siderofooride sünteesi, bioluminestsentsi, biofilmi moodustumist ja plasmiidide konjugatsiooni (Ren jt, 2004; Rutherford ja Bassler, 2012). QS üheks tähtsamaks eesmärgiks on õigeaegselt läbi viia energiakulukaid protsesse, mis toovad kasu tervele populatsioonile.

Sõltumata eesmärgist toimivad kõik QS süsteemid sarnase põhimõtte alusel. Süsteemi kuuluvate bakterite poolt sünteesitakse AI molekule, mis akumulereuvad keskkonnas. Populatsiooni tihenedes suureneb AI molekulide kontsentratsioon keskkonnas, kuni ületab signaali tunnetamiseks vajaliku lävendi. Signaali tajutakse tsütoplasmas või sisemembraanil paiknevate spetsiifiliste retseptoritega, mis omakorda mõjutavad transkriptsiooni toimumist märkladugeenidel (vt. joonis 2).

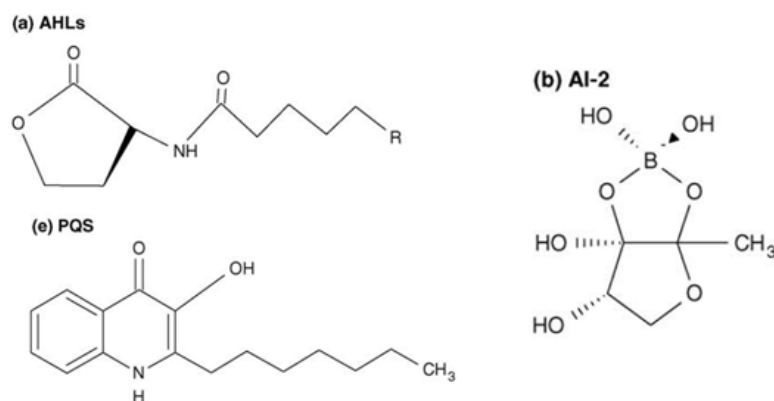


Joonis 2. Skeem kvoorumtunnetuse põhimehhanismist. Modifitseeritud joonise originaalversioon: [www.advancedhealing.com/quorum-sensing-and-biofilm](http://www.advancedhealing.com/quorum-sensing-and-biofilm)

Bakteritel on kirjeldatud on mitmeid QS signaalmolekule nagu N-atsüül-homoseriin laktoon (AHL), rasvhappe derivaadid, 4-kinoloonid, furanoonid (autoinduktor 2 - AI2) ja oligopeptiidid (Williams, 2006). Järgnevalt on antud ülevaade enimuuritud QS tüüpidest Gram-negatiivsetel bakteritel.

#### 1.2.2.1. Atsüül-homoseriin laktoon

Atsüül-homoseriin laktoon (*N-acyl-homoserine lactone* AHL) on üks enimuuritud QS signaalklassidest, mis reguleerib näiteks bioluminestsentsi, virulentsusfaktorite sünteesi, biofilmi moodustumist jpm (Fuqua ja Greenberg, 2002) (struktuuri vt. joonis 3). Erinevaid AHL molekule sünteesivad LuxI perekonna süntetaasid ja neid detekteerivad LuxR perekonna transkriptsiooni regulaatorid. Kõik AHL-id koosnevad üldjuhul atsüülahelast, mis on ühendatud homoseriinlaktooniga amiidsideme kaudu. Antud molekuli struktuur varieerub sõltuvalt spetsiifilistest signaalmehhanismidest. Eelkõige on mõjutatud atsüülahela pikkus, koosnedes neljast kuni kuueteistkümnest süsinikust (Fuqua ja Greenberg, 2002).



Joonis 3. QS signaalmolekulide struktuur. Kujutatud on Gram-negatiivsete bakterite enimuuritud QS signaalmolekulide struktuurid. a) AHL - atsüül-homoseriin laktoon; b) AI2 - autoinduktor 2; e) PQS - *Pseudomonas*-e kinolooni signaal (Decho jt, 2010).

Kõige tuntumaks AHL-sõltuvaks QS fenotüübiks on *Vibrio fischeri* bioluminestsents. Saavutades kõrge populatsioonitiheduse, hakkavad bakterid tootma valgust. Selline fenotüüp on arenenud soodustamaks sümbioosi süvaveekaladega, kelle tarbeks toodetava valguse eest saavad bakterid toitaineid. Sel viisil valguse tootmisele väljaspool peremeesorganismi ei ole leitud ühtegi teist funktsiooni (Fuqua ja Greenberg, 2002).

Üheks huvitavaks näiteks AHL kaudu toimivast mehhanismist on 2012. aastal avastatud QS süsteem, mida vajavad toimetulekuks *Burkholderia* perekonna liigid statsionaarses faasis. Probleemiks on mainitud liikide elutegevuseks sobimatu aluselise keskkonna teke. Leelistumise põhjuseks on aminohapete kasutus süsinikuallikana, mille deamineerimise tulemusel vabaneb ammoonium keskkonda ning pH tase tõuseb. *Burkholderia* liikidel on kasvava tihedusega kultuuris toimetulekuks kujunenud C8-HSL QS süsteem, millega aktiveeritakse oksalaadi süntees ja sekretsioon keskkonda. Selle tulemusena tagatakse neutraalne pH ja eluks kõlblik keskkond statsionaarses faasis (Rutherford ja Bassler, 2012).

#### 1.2.2.2. Alküül-kinoloonid

Lisaks AHL-le on laialt levinud QS signaalideks kinoloonid (struktuuri vt. joonis 3). *Pseudomonas aeruginosa* ja talle lähedased bakteriliigid on suutelised sünteesima mitmeid kinoloone. Osadel neist on tuvastatud antimikroobne aktiivsus, teised toimivad QS signaalidena ja indutseerivad rakukultuuri tihedusest sõltuvalt virulentsusgeene. Kinolooni klassi kuuluvaid ühendeid suudavad lisaks bakteritele sünteesida ka taimed ja teatud loomad (Rho jt, 1999; Heeb jt, 2011). Bakteritest on AQ klassi kuuluvaid molekule lisaks *P.*

*aeruginosa*-le leitud rakukultuuri supernatandist nii *P. putida*-s, *Burkholderia* perekonnas kui ka paljudes teistes liikides (Diggle jt, 2003).

*P. aeruginosa*-s sünteesitakse erinevaid kinoloonseid signaale (PQS), millest enamus baseerub 2-alküül-4(1H)-kinoloonil (AQ). Hüdrofoobsuse tõttu on AQ-d peamiselt (umbes 80%) seotud välismembraanidega või membraani vesiikulitega (Mashburn-Warren jt, 2008). AQ signaalid on seotud *P. aeruginosa* virulentsuse ning biofilmi moodustamise ja struktuuri säilitamisega (Diggle jt, 2006). PQS-sõltuvad süsteemid põhjustavad rakkude osalist lüüsumist ja DNA vabanemist keskkonda, mida kasutatakse biofilmi moodustamisel (Jimenez jt, 2012). PQS defektsetes tüvedes on tuvastatud virulentsuse langemist mitmeid kordi (Heeb jt, 2011).

### **1.2.2.3. Autoinduktor 2**

Eelpool kirjeldatud QS signaalidest on universaalne ning liikidevahelist suhtlust võimaldav vaid LuxS ensüümi poolt sünteesitud autoinduktor 2 (AI2) (struktuuri vt. joonis 3). AI2-e on leitud enam kui 50-l liigil nii Gram-positiivsetes kui Gram-negatiivsetes bakterites. (Xavier ja Bassler, 2003). Antud QS signaal on avastatud *Vibrio harveyi*-s ning see on seotud peamiselt virulentsuse ja biofilmi moodustamisega. AI2-e erinevad derivaadid võimaldavad bakteritel eristada enda ja teiste poolt sünteesitud signaale. Liigisiselt on signaalsüsteemide täpsem toimemehhanism teada (Federle, 2009), kuid selgusetuks on jäänud signaalide tõlgendamise viis eri liikide vahel (Galloway jt, 2011).

## **1.3. Bakterite evolutsioneerumine stressitingimustes**

DNA-s tekkinud mutatsioonid võivad olla raku jaoks kas kasulikud, kahjulikud või neutraalsed. Mutatsioonid jagunevad kaheks: spontaansed ja indutseeritud. Spontaansed mutatsioonid tekivad DNA replikatsiooni käigus valede nukleotiidide lisamisega. Indutseeritud mutatsioonid on seotud mutageenide tekitatud DNA kahjustustega. Mutatsioonid põhjustavad populatsioonis geneetilist varieeruvust, andes evolutsioonile uut materjali, millele toimib looduslik valik. Stressitingimustes kasvavad rakud aeglaselt ja eelise saavad antud tingimustega kõige paremini kohastunud rakud. Stressitingimuste paremat taluvust või suurenenud kasvukiirust võib põhjustada kas spetsiifiline punktmutatsioon või suuremad ümberkorraldused genoomis. Sellist selektiivses keskkonnas toimuvat muteerumisprotsessi, mis toimub rakupopulatsioonis, kus bakterite kasv on pärssitud, nimetatakse adaptiivseks või statsionaarse faasi mutageneesiks ning selle toimumise põhjuste kohta on levinud mitmeid hüpoteese (Foster, 1999; Rosenberg, 2001; Adams, 2004; Roth ja



Andersson, 2004; Tenailon jt, 2004; Wright, 2004; Ponder jt, 2005; Foster, 2007; MacLean jt, 2013). Teoreetiliste mudelite põhjal võib öelda, et kasulikke mutatsioone tekib selektsiooni tingimustes sõltumatult nende algsest põhjusest. Populatsioon adapteerub keskkonnaga kiiremini, kui üldine mutatsioonisagedus rakkudes on kõrge (sest sellega suureneb ka võimalus kasulike mutatsioonide tekkeks), kuid kasuliku mutatsiooni fikseerumise järel on eelisolukorras madalama mutatsioonisagedusega rakud. Vastasel juhul koguneb genoomi palju kahjulikke mutatsioone, mis vähendavad rakkude eluvõimelisust (Galhardo jt, 2007; MacLean jt, 2013).

### 1.3.1. Statsionaarse faasi mutageneesi molekulaarsed mehhanismid

Mutatsioonide tekkeks on mitmeid põhjuseid, kuid statsionaarse faasi rakkudes toimuva madala replikatsioonitaseme ja stressi tekitava keskkonna tõttu arvatakse, et enamus statsionaarse faasi rakkudes tekkinud mutatsioonidest on seotud DNA kahjustuste tekke ja nende parandamisega. DNA-d kahjustavad tegurid võivad olla kas endogeense või eksogeense päritoluga. Endogeenset päritolu kahjustusi põhjustavad ained, mis tekivad rakus normaalse metabolismi käigus, näiteks alküleerivad ühendid ja hapnikuradikaalid (Foster, 2007). Eksogeense päritoluga on erinevad kiirgused (UV-kiirgus, röntgenkiirgus), antibiootikumid ja mitmesugused DNA-d kahjustavad kemikaalid (Friedberg jt, 2004; Pitcher jt, 2007).

Üheks enimkasutatud mudeliks statsionaarse faasi mutageneesi uurimisel on *E. coli* FC40 tüvi (Cairns ja Foster, 1991), milles on kromosomaalne *lacZ* geen deleteeritud. *lacZ* geenilt kodeeritav  $\beta$ -galaktosidaas võimaldab bakteritel kasutada laktoosi ainsa süsiniku allikana (Cupples ja Miller, 1988). *E. coli* FC40 sisaldab *lacI-lacZ* liitjärjestusega F' plasmidi, milles *lacI* geen on +1 raaminihke mutatsioon. Liitjärjestuse olev mutatsioon vähendab  $\beta$ -galaktosidaasi aktiivsust umbes 1%-ni algsest, mis ei ole piisav rakkude kasvuks laktoosil (Cairns ja Foster, 1991). Katse põhineb  $Lac^+$  reventantide kolooniate detekteerimisel laktoos-minimaal plaatidel. Teisel päeval pärast plaatimist ilmuvad nähtavale esimesed  $Lac^+$  reventantide kolooniad, mille  $Lac^+$  fenotüüpi põhjustanud mutatsioonid on tekkinud vedelsöötmes ilma selektsioonita kasvanud bakterites. Alates kolmandast päevast akumulereuvad  $Lac^+$  kolooniad, mis on tekkinud selektiivtingimustes statsionaarse faasi mutageneesi tulemusel ja nende edasine tekkesagedus on konstantne (Cairns ja Foster, 1991). Samas peab arvestama, et pärast viiendat päeva tekkinud kolooniatest on ligikaudu 2%  $Lac^-$ . Kuna *lac^-* alleel lekib vähesel määral, siis võimaldab neil kolooniatel laktoosil kasvamist *lac^-* alleeli amplifitseerumine (Foster ja Trimarchi, 1994). Kui mitteselektiivses tingimustes tekib  $Lac^+$  mutante minimaalselt, siis  $Lac^+$  mutantide tekkesagedus laktoosi selektsiooni puhul

suureneb tunduvalt (kuni 50 mutanti  $10^8$  raku kohta päevas) (Cairns ja Foster, 1991; Foster ja Trimarchi, 1994).

Statsionaarses faasis tekkinud  $\text{Lac}^+$  revertantide mutatsioonispekter erineb kasvava kultuuri  $\text{Lac}^+$  mutantide omast, sisaldades peamiselt 1 ap deletsioone, mis on tekkinud mononukleotiidsetes kordusjärjestustes. Kasvavas kultuuris tekkinud  $\text{Lac}^+$  mutantidel esineb nii suuremaid deletsioone, duplikatsioone kui ka raaminihkeid (Foster ja Trimarchi, 1994). Statsionaarses faasis tekkinud  $\text{Lac}^+$  mutatsioonide tekkemehhanismid erinevad kasvavates rakkudes tekkinud mutatsioonide omast. Statsionaarses faasis tekkinud  $\text{Lac}^+$  mutatsioonide tekkeks on vaja kaheaahelaliste katkete parandamisega seotud homoloogilise rekombinatsiooni ensüüme RecA, RecBCD ja RuvABC (Cairns ja Foster, 1991; Foster jt, 1996). Võrreldes plasmiidse lokalisatsiooniga väheneb kromosomaalse lokalisatsiooniga *lac* alleeli puhul revertantide tekkesagedus 100 korda (Foster ja Trimarchi, 1995). Teiseks peavad olema ekspresseeritud plasmidi konjugatsiooniks vajalikud valgud, mis teevad plasmidi katke *oriT* piirkonnas, konjugatsioon ise vajalik ei ole (Foster ja Trimarchi, 1995).

Lisaks on ka RpoS-il oluline roll  $\text{Lac}^+$  revertantide tekkes. Esiteks suurendab RpoS vigaderohke DNA polümeraasi Pol IV ekspressioonitaset statsionaarse faasi rakkudes, millest tulenevalt on kuni 80%  $\text{Lac}^+$  fenotüüpi põhjustavatest mutatsioonidest Pol IV-st sõltuvad (McKenzie jt, 2001; Lombardo jt, 2004). Teiseks vähendab RpoS DNA valepaardumisi kõrvaldava *mismatch* reparatsiooni (MMR) taset *E. coli* statsionaarse faasi rakkudes (Tsui jt, 1997). MMR on vajalik valepaardumiste tuvastamiseks DNA kaksikahelas ja nende likvideerimiseks. *E. coli* tüve FC40 puhul ilmnes, et MMR valkude üleekspressioonil väheneb  $\text{Lac}^+$  mutatsioonide tekkesagedus (Foster ja Trimarchi, 1995; Foster, 1999). Sarnast MMR valkude üleekspressiooni mõju on näidatud ka kasvavate rakkude mutatsioonisagedusele, mis viitab MMR valkude limitatsioonist tingitud  $\text{Lac}^+$  mutatsioonide tekkele (Foster, 1999).

$\text{Lac}^+$  mutantide tekkemehhanismide selgitamiseks *E. coli* tüve FC40 statsionaarse faasi rakkudes on kaks mudelit: juba eelpool kirjeldatud homoloogilisest rekombinatsioonist sõltuv mutagenees (RMD) ja *lac* alleeli amplifikatsioonist sõltuv mutatsioon (AMD) (Rosenberg ja Hastings, 2004; Roth ja Andersson, 2004).

RMD mudeli järgi indutseerib mutatsioonide teket DNA kaheaahelaline katke, mille teke on F plasmidis sagedasti toimuv protsess. Kaheaahelaline DNA katke initsieerib homoloogilise rekombinatsiooni, mille käigus võivad DNA vastasahelat sünteesida nii Pol II, Pol III kui Pol IV. Kui sünteesitav DNA sisaldab *lac* regiooni, võivad spontaansete mutatsioonide tulemusena tekkida  $\text{Lac}^+$  mutandid (Foster, 2007).

ADM mudeli kohaselt initsieerib mutageneesi *lac* regiooni sisaldava DNA duplitseerumine, mis toimub kõrge sagedusega, ühel juhul tuhande raku kohta. Laktoosil kasvades on *lac* duplikatsioonidega rakkudel piisavalt energiat, et amplifitseerimaks *lac* regiooni RecA ja RecBCD sõltuva mehhanismi abil. Aeglase *lac* regiooni amplifitseerimise tagajärjel on rohkem potentsiaalseid märklaudu Lac<sup>+</sup> mutatsioonide tekkeks (Roth ja Andersson, 2004; Foster, 2007)

Statsionaarse faasi mutageneesi on lisaks *E. coli*-le uuritud veel Gram-positiivse bakteri *Bacillus subtilis* tüves YB955. Tegemist on auksotroofse tüvega, mis ei suuda sünteesida histidiini, metioniini ega leutsiini. Inkubeerides YB955 tüve rakke söötmel, milles puudub üks neist aminohapetest, hakkab akumuleeruma prototoofseid revertante, millede tekkesagedus on üheksa päeva jooksul konstantne (Sung ja Yasbin, 2002). Erinevalt *E. coli* tüves FC40 kirjeldatud statsionaarse faasi mutatsioonidest ei vajanud *B. subtilis* tekkinud mutatsioonid ei RecA valku ega homoloogilist rekombinatsiooni (Sung ja Yasbin, 2002; Foster, 2007). Samas kirjeldati *B. subtilis*-e rakkudes aga sarnaselt *E. coli*-le vigaderohke DNA polümeraasi YqjH osalust statsionaarse faasi mutageneesil (Sung jt, 2003). Lisaks näidati, et *B. subtilis*-es indutseerib statsionaarse faasi mutatsioonide teket Mfd (Ross jt, 2006) ja ComA (Sung ja Yasbin, 2002).

Vigaderohke DNA polümeraasi Pol IV osalust statsionaarse faasi mutageneesil on näidatud ka bakteris *P. putida*, kus on uuritud fenooli lagundavate Phe<sup>+</sup> revertantide teket 1 ap deletsiooni tulemusena plasmiidis, mis kannab raaminihke mutatsiooniga fenooli monooksügenaasi geeni *pheA* alleeli (Tegova jt, 2004). Phe<sup>+</sup> revertantide teket *P. putida* statsionaarse faasi rakkudes (nii raaminihke mutatsioonide kui ka asendusmutatsioonide teket) soodustavad ka nukleotiidi väljalõike reparatsiooni NER ensüümid (Tark jt, 2008). Samuti soodustavad *P. putida* nälgivates rakkudes statsionaarse faasi mutatsioonide teket DNA oksüdatiivsed kahjustused (Saumaa jt, 2002; Saumaa jt, 2006) ning reaktiivsete hapnikuvormide (ROS) olemasolu rakkudes (Tarassova jt, 2009). Sarnaselt *B. subtilis*-ele ei vaja statsionaarse faasi mutageneesi bakteris *P. putida* RecA valgus funktsioone (Tegova jt, 2004).

### 1.3.2. Mutatsioonisagedust mõjutavad tegurid bakteri kromosoomis

Mitmed uuringud on viidanud mutatsioonisageduse varieeruvusele kromosoomi eri piirkondades. Sekveneeritud genoomide analüüsimisel on selgunud, et enamusel  $\alpha$ - ja  $\gamma$ -proteobakteritel esineb *oriC* läheduses paiknevatel geenidel vähem asendusmutatsioone kui kaugemal asuvatel (Sharp jt, 1989; Mira ja Ochman, 2002). Samal ajal pole *in vivo* katsetes

sarnast efekti nähtud. Näiteks *Salmonella enterica* kromosoomis on viidud läbi katse, kus nelja eri lokalisatsiooni on inserteeritud mutantne *lacZ* geen. Lac<sup>+</sup> revertentide sageduste võrdlemise tulemusena selgus, et mutatsioonisagedus sõltub pigem regionaalsest efektist kui *oriC* kaugusest (Hudson jt, 2002). Kromosomaalse lokalisatsiooni mõju mutatsioonisagedusele on näidatud ka *E. coli*-s, kus raaminihke mutatsioonide uurimiseks viidi erinevatesse kromosoomi piirkondadesse muteeritud klooramfenikooli (bakteristaatiline antibiootikum) atsetüültransferaasi geen. Erinevates kromosoomi piirkondades nähti varieeruvust nii MMR süsteemi efektiivsuses kui ka DNA replikatsioonil tekkinud vigade tekkesageduses (Martina jt, 2012).

Teiseks suunaks genoomis toimuvate mutatsiooniprotsesside uurimisel on olnud mutatsioonisageduste võrdlemine juhtivas ja mahajäävas ahelas. Enamus uuringutest on viidud läbi *E. coli* tüves, kuhu on inserteeritud mutantne *lacZ* geen. Katsetes võrreldakse isogeenseid tüvesid, mis erinevad teineteisest *lacZ* geeni orientatsiooni poolest replikatsioonikahvli liikumise suhtes. Replikatsioonivigade tuvastamiseks kasutati MMR defektset tüve ning leiti, et mahajääval ahelal on suurem mutatsioonisagedus kui juhtival ahelal (Gawel jt, 2002). Vigaderohkete DNA polümeraaside mõju uurimiseks on kasutatud *E. coli* tüve, kus SOS süsteem oli konstitutiivselt ekspresseeritud. Sellise testsüsteemi puhul tekkis samuti rohkem mutatsioone mahajäävas ahelas (Maliszewska-Tkaczyk jt, 2000). Samas nähti asendusmutatsioone tuvastavat testsüsteemi kasutades kõrgemat mutatsioonisagedust juhtiva ahela puhul (Fijalkowska jt, 1998). UV indutseeritud mutatsioonide uurimisel aga erinevusi juhtiva ja mahajääva ahela mutatsioonisagedustes ei nähtud (Gawel jt, 2002).

## 2. Eksperimentaalosa

### 2.1. Töö eesmärk

Selleks, et uurida mutatsiooniprotsesse bakteri *P. putida* kromosoomi erinevates piirkondades, konstrueeris Triinu Juurik meie laboris *lacI-P<sub>lac</sub>pheBA* testsüsteemi, mis võimaldab detekteerida mutatsioone, mis inaktiveerivad LacI repressori või tema seondumissaidi (Juurik, 2011). Selle testsüsteemi abil nägime, et mutatsioonisagedus varieerus sõltuvalt testsüsteemi lokalisatsioonist kromosoomis (Juurik jt, 2012). Lisaks oli Triinu oma magistritöös viinud läbi pilootkatse LacI-d inaktiveerivate mutatsioonide spektri määramiseks kromosoomi erinevates piirkondades ning saadud andmed viitasid sellele, et testsüsteemi asukoht kromosoomis mõjutab ka mutatsioonispektrit (Juurik, 2011). Antud testsüsteem võimaldab uurida nii kasvavates rakkudes kui ka statsionaarses faasi rakkudes tekkinud mutatsioone.

Selleks, et uurida täpsemalt mutatsioonide tekke dünaamikat kromosoomi erinevates piirkondades, oli minu töö esimeseks eesmärgiks võrrelda mutatsioonispektrit suurema hulga testgeeni lokalisatsioonide puhul ning erinevatel päevadel selektiivsöötmele tekkinud mutantides.

Kuna sarnasel fenooli lagundamist võimaldaval testsüsteemil on varem nähtud selektiivsöötmele akumulbeerunud mutantide kolooniate inhibeerivat mõju uute kolooniate moodustumisele, oli minu töö teiseks eesmärgiks uurida statsionaarse faasi mutantide akumulatsiooni pärssivaid mehhanisme.

## 2.2. Materjal ja metoodika

### 2.2.1. Söötmed, bakteritüved ja plasmiidid

Söötmetena on kasutatud LB-söödet (Miller, 1972) või M9 minimaalsöödet (Adams, 1959), millele lisati mikroelementide lahust (Bauchop ja Elsdén, 1960) ning süsinikuallikana glükoosi (Glc) lõpp-kontsentratsiooniga 10 mM või fenooli (Phe) lõppkontsentratsiooniga 2,5 mM. Glükoos vedelsöötmesse on lisatud kaseiini hüdrolysaati (CAA) lõppkontsentratsiooniga 0,2%.

Plasmidi või tüve selektsiooniks on kasutatud järgmisi antibiootikume: kanamütsiini (Km; 50 µg /ml), streptomütsiini (Sm; 200 mg/ml), karbenitsilliini (Cb; 1-3 mg/ml), rifampitsiini (Rif; 100 µg/ml), tetratsükliini (Tet; *E. coli*-l 10 µg/ml; *P. putida*-l 50 µg/ml).

*Escherichia coli* rakke on kasvatatud temperatuuril 37°C ja *Pseudomonas putida* rakke temperatuuril 30°C. Vedelsöötmes kasvatamisel aereeriti kultuure loksutil. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Töös kasutatavad bakteritüved ja plasmiidid

Tüve nimi	Iseloomustus	Allikas
<i>Escherichia coli</i>		
CC118λpir	Δ( <i>ara-leu</i> ) <i>araD</i> Δ <i>lacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE</i> (Am)	(Herrero jt, 1990)
DH5αλpir	<i>supE44, Δ lacU169 (f80 lacZΔM15), hsdR17 (rk-mk+), recA1, endA1, thi1, gyrA, relA</i>	(Hanahan ja Meselson, 1983)
HB101	<i>subE44 subF58 hsdS3 (rB-mB-) recA13 proΔ2 lacY1 galK2 rsp20 xyl-5 mt1-1</i>	(Boyer ja Roulland-Dussoix, 1969)
MG 1655	<i>E. coli</i> algne tüvi	(Miller, 1992)
<i>Pseudomonas putida</i>		
PaW85	<i>P. putida</i> algne tüvi	(Bayley jt, 1977)
phe-lacI_5	PaW85, mis sisaldab phe-lacI testsüsteemi kromosomaalses lokaliseerimises PP0340	(Juurik, 2011)
phe-lacI_10	PaW85, mis sisaldab phe-lacI testsüsteemi kromosomaalses lokaliseerimises PP4644	(Juurik, 2011)
phe-lacI_115	PaW85, mis sisaldab phe-lacI testsüsteemi kromosomaalses lokaliseerimises PP3579	(Juurik, 2011)
phe-lacI_117	PaW85, mis sisaldab phe-lacI testsüsteemi kromosomaalses lokaliseerimises PP4158	(Juurik, 2011)
phe-lacI_18	PaW85, mis sisaldab phe-lacI testsüsteemi kromosomaalses lokaliseerimises PP3728	(Juurik, 2011)
phe-lacI_19	PaW85, mis sisaldab phe-lacI testsüsteemi kromosomaalses lokaliseerimises PP2764	(Juurik, 2011)
phe-lacI_31	PaW85, mis sisaldab phe-lacI testsüsteemi kromosomaalses lokaliseerimises PP4050	(Juurik, 2011)
phe-lacI_30	PaW85, mis sisaldab phe-lacI testsüsteemi kromosomaalses lokaliseerimises PP2316	(Juurik, 2011)
phe A+C_3.1	PaW85 tüvi, mis sisaldab miniTn5 koosseisus funktsionaalset	(Juurik, 2011)

	pheA+C geenikasseti (Sm <sup>r</sup> )	
<b>PaWΔPP_3584</b>	<i>P. putida</i> algne tüvi, milles on deleteeritud geen PP_3584	käesolev töö
<b>PheA<sup>+</sup>ΔPP_3584</b>	pheA+C_3.1 algne tüvi, milles on deleteeritud geen PP_3584	käesolev töö
<b>PheA<sup>+</sup>ΔPP_4173</b>	pheA+C_3.1 algne tüvi, milles on deleteeritud geen PP_4173	käesolev töö
<b>PaWΔPP_4173</b>	<i>P. putida</i> algne tüvi, milles on deleteeritud geen PP_4173	käesolev töö
<b><i>Pseudomonas fluorescens</i></b>		(Merimaa jt, 2006)
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1</b>	PAO1 algne tüvi	(Stover jt, 2000)
<b><i>Pseudomonas fragi</i></b>		Geneetika õppetooli labori kolleksioon, Eeva Heinaru
<b><i>Pseudomonas syringae</i></b>		Geneetika õppetooli labori kolleksioon, Eeva Heinaru
<b>pRK2013</b>	Konjugatiivse ülekande abi-plasmiid	(Figurski ja Helinski, 1979)
<b>pBam1</b>	Km <sup>r</sup> , Amp <sup>r</sup> , oriR6K	(Martinez-Garcia jt, 2011)
<b>pJP5603-I-sceI<sub>v2</sub></b>	I-SceI restriksioonisaite ja multikloneerimisjärjestust sisaldav suitsiidplasmiid (Km <sup>r</sup> )	(Martinez-Garcia ja de Lorenzo, 2011)
<b>pSW(I-SceI)</b>	I-SceI nukleaasi ekspresseeriv plasmiid (Amp <sup>r</sup> , Cb <sup>r</sup> )	(Wong ja Mekalanos, 2000)

### 2.2.2. PCR

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) on viidud läbi järgnevalt: Matriitsina on kasutatud bakterirakke või ~10 ng isoleeritud DNA-d. Reaktsioonimahuks on 20 µl ja reaktsioonisegu sisaldab järgmisi komponente: 75 mM Tris-HCl (pH 8,8), 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01% Triton X 100, 0,5% Ficoll 40, 1 mM tartasiin. Enne PCR-i reaktsiooni käivitamist on lisatud MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM lõppkontsentratsiooniga, dNTP-d 0,2 mM lõppkontsentratsiooniga, 0,5 u prof. Juhan Sedmani laboris puhastatud Taq polümeraasi, 10 pmol praimereid (tabel 2), ~10 ng isoleeritud DNA-d või rakususpensiooni ning autoklaavitud destilleeritud H<sub>2</sub>O-d lõppmahuni 20 µl. PCR on teostatud firma „Biometra“ ja „Eppendorf“ PCR-i masinatega. Praimeritena kasutatud oligonukleotiidid on toodud tabelis 2.

Valdavalt on läbi viidud 25 - 30 tsüklit, mis on toimunud järgmistel tingimustel:

1. DNA denaturatsioon – 0,5 minutit temperatuuril 96°C;
2. Praimeri seondumine matriits-DNA-le – 0,5 minutit temperatuuril 54-57°C;

3. DNA süntees – ligikaudu 1 - 3,5 minutit (sõltuvalt amplifitseeritava DNA fragmendi pikkusest, arvestatuna 1 minut 1000 nukleotiidi kohta) temperatuuril 72°C.

Tsüklitele eelnes paariminutiline kuumutamine temperatuuril 96°C ja järgnes mõne minuti pikkune sünteesijärk, mille käigus sünteesiti lõpuni veel poolel olevad fragmendid.

Tabel 2. Töös kasutatud oligonukleotiidid

Nimetus	Nukleotiidne järjestus	Seondumissait
<b>ARB-PCR-i läbi viimiseks kasutatud praimerid</b>		
<b>ARB2</b>	5'- GGCCACGCGTCGACTAGTA C-3'	seondub kōdupraimeri konserveerunud 5' otsaga
<b>ARB6</b>	5'- GGCCACGCGTCGACTAGTA C	kōdupraimer, mille linkerregiooni ACGCC on <i>P. putida</i> kromosoomis 12050 kordust
<b>Smsaba</b>	5'- GAAGTAATCGCAACATCCG C-3'	komplementaarne Sm <sup>r</sup> resistentsusgeeni järgse alaga st positsioonides 202 kuni 221 arvestatuna TAA stopkoodonist suunaga geenist eemale
<b>SmSplõpp</b>	5'- GCTGATCCGGTGGATGACCT -3'	komplementaarne Sm <sup>r</sup> resistentsusgeeni järgse alaga st positsioonides 249 kuni 268 arvestatuna TAA stopkoodonist suunaga geenist eemale
<b>BAM-1</b>	5'- TTATGTAA GCA GACA GTTTT -3'	komplementaarne Km <sup>r</sup> resistentsusgeeni initsiaatorkoodonist ATG ette jääval ala positsioonides -21 kuni -40 suunaga geenist välja
<b>Me1 Uus2</b>	5'- TATCTTGTGCAATGTAACAT CA GAG-3'	komplementaarne Km <sup>r</sup> resistentsusgeeni initsiaatorkoodonist ATG ette jääval ala positsioonides -63 kuni -87 suunaga geenist välja
<b>Geeni PP_4173 deleteerimiseks kasutatud praimerid</b>		
<b>EcoRPP417 3-1</b>	5'- AAGGAATTCTGTTGCCGCA GGCCAGGCG-3'	komplementaarne geeni PP_4173 eelse alaga positsioonides -496 kuni -476 arvestatuna startkoodonist ATG ja suunaga geeni poole, 5' otsas asub EcoR1 restriksioonisait
<b>PP4173sisse</b>	5'- CAGGACGACTGGCTGTGGG T-3'	komplementaarne geenist PP_4173 eelse alaga positsioonides -183 kuni -164 arvestatuna startkoodonist suunaga geeni poole
<b>PP4173- 1REV</b>	5'- AGTGTTTAA GACTGCCGCAC AAGCGTTTGCTCATGGGGT- 3'	3' ots on komplementaarne geeni PP_4173 alaga positsioonides 15 kuni -5 arvestatuna startkoodonist ATG ning suunatud geeni poole, 5' otsaga on komplementaarne positsioonidega 1953 kuni 1934, arvestatuna startkoodonist ja suunatud geenist eemale
<b>PP4173- 2FW</b>	5'- GTGCGGCA GTCTTAAACACT -3'	komplementaarne geeni PP_4173 alaga positsioonides 1934 kuni 1953 arvestatuna startkoodonist ATG ja suunaga geenist eemale
<b>PP4173- 2BHEV</b>	5'- TATGGATCCCTGCCAGCCGA GGAA GAA-3'	komplekomplementaarne geeni PP_4173 järgse alaga positsioonides 492 kuni 480 arvestatuna stopkoodonist TAA ja suunaga geeni poole, sisaldab 5' otsas BamH1 restriksioonisaiti
<b>PP4173out</b>	5'- GGTAGACTATTGCGTTGTGG T-3'	komplementaarne geeni PP_4173 alaga positsioonides 2053 kuni 2033 arvestatuna startkoodonist ATG ja suunaga geeni poole
<b>Geeni PP_4708 deleteerimiseks kasutatud praimerid</b>		
<b>4708Fw1</b>	5'- AGAGCTCAAAGCTCAGATC GTTGCCGA-3'	komplementaarne geeni PP_4708 eelse alaga positsioonides -498 kuni -478 arvestatuna geeni startkoodonist GTG, suunaga geeni poole, sisaldab 5' otsas SacI restriksioonisaiti
<b>4708Rev1</b>	5'- CGTTCGCTTAGACGCCCGAC	3' otsaga on komplementaarne geeni PP_4708 eelse alaga positsioonides -11 kuni -31 arvestatuna startkoodonist



	TTTTTCAGTGGCTCTTGGGG-3'	GTG ja 5'otsaga on komplementaarne geeni alaga positsioonides 2113 kuni 2095 arvestatuna startkoodonist GTG, suunaga geenist eemale
<b>4708Fw2</b>	5'-TCGGGCGTCTAAGCGAACG-3'	komplementaarne geeni PP_4708 alaga positsioonides 2113 kuni 2095 arvestatuna startkoodonist GTG
<b>4708Rev2</b>	5'-AGGATCCACGCCTTGGCTGTCTCGAC-3'	komplementaarne geeni PP_4708 järgse alaga positsioonides 504 kuni 484 arvestatuna stopkoodonist TAA, suunaga geeni poole, sisaldab 5'otsas BamH1 restriksioonisaiti
<b>4708IN</b>	5'-GCCTCGTGTTGTATCTGGAC-3'	komplementaarne geeni PP_4708 eelse alaga positsioonides -104 kuni -85 arvestatuna startkoodonist GTG, suunaga geeni poole
<b>4708OUT</b>	5'-AGAAACCCTTGCCTGGATC-3'	komplementaarne geeni PP_4708 alaga positsioonides 168 kuni 150 arvestatuna startkoodonist GTG, suunaga geenist eemale
<b>Geeni PP_3584 deleteerimiseks kasutatud praimerid</b>		
<b>3584Fw1</b>	5'-AGAATTCGCGGTGACAGCAAGCTGCAATC-3'	komplementaarne geeni PP_3584 eelse alaga positsioonides -496 kuni -473 arvestatuna startkoodonist ATG suunaga geeni poole, sisaldab 5'otsas EcorI restriksioonisaiti
<b>3584Rev1</b>	5'-CGTCTTCTTGA CGATACCGAGAGGTT CATGCGCCCGCCTT-3'	3' otsaga on komplementaarne geeni PP_3584 alaga positsioonides 252 kuni 231 arvestatuna startkoodonist ATG, suunaga geenist eemale, 5'otsaga on komplementaarne geeni alaga positsioonides 2676 kuni 2657 arvestatuna startkoodonist ATG, suunaga geenist eemale
<b>3584Fw2</b>	5'-CGGTATCGTCAAGAAGAACG-3'	komplementaarne geeni PP_3584 alaga positsioonides 2657 kuni 2675 arvestatuna startkoodonist ATG, suunaga geenist välja
<b>3584Rev2</b>	5'-AGGATCCATGACTACCCGTGTCGAACC-3'	komplementaarne geeni PP_3584 järgse alaga positsioonides 293 kuni 274 arvestatuna stopkoodonist TGA, suunaga geeni poole, sisaldab 5'otsas BamH1 restriksioonisaiti
<b>3584IN</b>	5'-GGAA GTGGTCGAAGACAGCTC-3'	komplementaarne geeni PP_3584 eelse alaga positsioonides -126 kuni -104 arvestatuna startkoodonist ATG, suunaga geeni poole
<b>3584OUT</b>	5'-AACTGGTCGAGGCCATCTGTTTC-3'	komplementaarne geeni PP_3584 alaga positsioonides 252 kuni 230 arvestatuna startkoodonist ATG, suunaga geenist eemale
<b>pSW plasmidi kontrolliks kasutatud praimerid</b>		
<b>pSW-F</b>	5'-GGACGCTTCGCTGAAAAC-3'	komplementaarne plasmidis pSW(I-sceI) oleva järjestusega, suunaga multiklonerimisjärjestuse poole
<b>pSW-R</b>	5'-AACGTCGTGACTGGGAAAA-3'	komplementaarne plasmidis pSW(I-sceI) oleva järjestusega, suunaga multiklonerimisjärjestuse poole
<b>Mutantide analüüsiks kasutatud praimerid</b>		
<b>lacopRev</b>	5'-GATCCTCTAGATCGACCTG-3'	komplementaarne <i>lacI</i> geeni eelse alaga positsioonides -420 kuni -401 initsiaatorkoodonist GTG
<b>lacIloppsise1</b>	5'-CACTGCCCCGCTTCCAGTC-3'	komplementaarne <i>lacI</i> geeni positsioonidega 1080 kuni 1062
<b>lacIalgus</b>	5'-GCGGTATGGCATGATAGCG-3'	komplementaarne <i>lacI</i> geeni eelse alaga positsioonides -50 kuni -32 initsiaatorkoodonist GTG, suunaga geeni poole
<b>lacI3</b>	5'-CATCGCAGTGGGAACGATG-3'	komplementaarne <i>lacI</i> geeni positsioonidega 726 kuni 708

### 2.2.3. Geelelektroforees

PCR tulemused on analüüsitud geelelektroforeesil, selleks on lisatud 20 µl proovile 4 µl geelektroforeesivärvi (0,04%-list broomfenoolsinise lahust 50%-ses glütseroolis). Proovid on kantud horisontaalsele 1%-sele agarosgeelile TAE puhvis (50 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA; pH 8,2). Geel sisaldab etiidiumbromiidi 0,1 µg/ml. DNA fragmentide pikkuste määramiseks on kasutatud firma „Fermentas“ markerit „ZipRuler Express DNA Ladder 2“. Geelelektroforees on viidud läbi toatemperatuuril, pingel 10 – 15 V/cm. Geel on pildistatud ultravioletvalguses.

### 2.2.4. Bakterite elektroporatsioon

*E. coli* rakkude elektroporatsioonil on kasutatud Sharma ja Schimke meetodit (Sharma ja Schimke, 1996). Kompetentsete rakkude saamiseks on lahjendatud üleöö LB-vedelsöötmes kasvanud *E. coli* tüvesid DH5α λpir ja CC118λpir optilise tiheduseni A580 = 0,1 ning kasvatatud 1,5-2 tundi, kuni bakterikultuur on jõudnud optilise tiheduseni A580 = 1-1,5. Rakud on tsentrifuugitud söötimest põhja 12000 × g 30 sekundi vältel firma „Eppendorf“ lauatsentrifuugiga „Mini Spin“ ja seejärel on eemaldatud supernatant. Järgnevalt on *E. coli* rakke pestud kolm korda 700 µl 10%-se glütserooliga ja suspendeeritud 100 µl 10%-ses glütseroolis.

Elektroporatsiooniks on lisatud *E. coli* rakkudele ligikaudu 100 ng vees lahustatud plasmiidset DNA-d ning rakud on seejärel pipeteeritud elektroporatsiooniküvetti. Elektroporatsioon on teostatud firma „BioRad“ elektroporaatoriga „*E. coli* Pulser“ pingel 2500 V. Pärast elektroporatsiooni on rakkudele lisatud 1 ml LB-söödet ja kasvatatud ligikaudu tund aega termostaadis temperatuuril 37°C. Seejärel on rakud tsentrifuugitud söötimest põhja, eemaldatud supernatant, suspendeeritud 100 µl LB-söötmes ja plaaditud selektiivtassidele.

### 2.2.5. Bakterite konjugatsioon

Homoloogilise rekombinatsiooni läbiviimiseks algse ja katkestatud geeni vahel on kasutatud bakterite konjugatsiooni. Selle läbiviimiseks on kasvatatud üleöö doonortüvena katkestusplasmismiidi sisaldavat *E. coli* CC118 λpir või DH5αλpir tüve, helperplasmiiidi pRK2013 sisaldavat *E. coli* tüve HB101 ning soovitud *P. putida* tüve. Üleöö kasvanud kultuuridest on tehtud kahekümnekordsed lahjendused värskettesse LB söötmetesse ning kasvatatud ilma antibiootikumideta. Ristamissegude jaoks on võetud ajapunktidel 1,5 ja 2,5 tundi *E. coli* kultuurist 50 µl ja *P. putida* kultuurist 100 µl, segatud kokku ning pipeteeritud sellest 100 µl LB-tassile. Baktereid on kasvatatud üleöö 30°C termostaadis. Üleöö kasvanud

rakud on kraabitud plaadilt ning suspendeeritud 1 ml-s 1 x M9. Suspensioonist on pipeteeritud 100 µl selektiivsöötmetele, kus on võimalised kasvama vaid homoloogilise rekombinatsiooni tulemusel tekkinud *P. putida* mutandid.

#### **2.2.6. Plasmiidse DNA eraldamine „Axygen“ kitiga ja restriksioonanalüüs**

Plasmiidse DNA eraldamiseks „Axygen AxyPrep™ Plasmid Miniprep“ kitiga on kasvatatud plasmidi sisaldavaid *E. coli* rakke üleöö 5 ml-s LB-söötmes plasmidi selektsiooniks vajaliku antibiootikumi juuresolekul. Järgnevalt on rakud tsentrifuugitud põhja 30 sekundi vältel ja suspendeeritud 250 µl S1 puhvris (RNAasA-d sisaldav lahus). Kõik tsentrifuugimised on viidud läbi maksimumpööratel ( $12000 \times g$ ), kasutades firma „Eppendorf“ lauatsentrifuugi „Mini Spin“. Rakkude lüüsimiseks on lisatud suspensioonile 250 µl S2 puhvrit (lüsotsüümi lahus) ja seejärel hoitud toatemperatuuril 5 minutit pidevalt segades. Järgnevalt on lisatud 350 µl S3 puhvrit (neutraliseeriv lahus), segatud ning lüüsunud rakkude kestad ja kromosoom-vaalkompleks on tsentrifuugitud 10 minuti jooksul põhja. Seejärel on pipeteeritud supernatant kolonni ning tsentrifuugitud 1 minut, mille jooksul toimub DNA seondumine kolonni maatriksile. Soolade eemaldamiseks on pipeteeritud kolonni 700 µl pesupuhvrit W2 ning tsentrifuugitud 1 minut. Seejärel on DNA elueeritud 60 µl elueerimislahuses.

DNA restriksiooniks on kasutatud firma „Fermentas“ ensüüme. Reaktsioonid on viidud läbi tingimustel, mis on ette nähtud vastavaid restriktase tootva firma poolt koostatud ensüümide kataloogis.

#### **2.2.7. Phe<sup>+</sup> mutantide akumulatsioonikatse**

Akumulatsioonikatseks on kasvatatud üleöö 4 ml-s glükoos-minimaalsöötmes testsüsteemi sisaldavaid tüvesid ning taustarakkudeks on tüve *P. putida* PaW85 rakud. Üleöö kasvanud testsüsteemiga tüvede kultuuridest on tehtud neljakordsed lahjendused 1 x M9-sse. 10 µl neljakordse lahjendusega testtüvede rakke on seejärel plaaditud koos 250 µl algtüve rakkudega 2,5 mM fenoolminimaaltassidele ning inkubeeritud temperatuuril 30°C 12 päeva. Taustarakud on lisatud saavutamaks teiste testsüsteemide kasutamisega võrreldav rakkude arv plaadil ( $\sim 1 \times 10^9$ ), et kõigis katsetes oleksid samad tingimused.

#### **2.2.8. *P. putida* nälgiva populatsiooni elumuse määramine**

Bakterirakkude elumust on määratud kogu nälgimisperioodi jooksul kolooniat moodustavate rakkude (CFU-Colony Forming Units) arvukuse alusel samadelt fenooli minimaaltassidelt, millel on jälgitud Phe<sup>+</sup> revertantide teket. 1-ml pipetiotsikut kasutades on

lõigatud tassidelt agaritükikesed, kus ei ole nähtavaid Phe<sup>+</sup> kolooniaid, suspendeeritud nendel olevad rakud 1 x M9 lahuses, tehtud vastavad lahjendused ning plaaditud glükoos-Tel tassidele. Agariketta pindala moodustab 1/100 kogu tassi pindalast. Lähtudes glükoos-Tel tassidele tekkinud kolooniate arvust, tehtud lahjendustest ja agariketta pindalast, on arvatud elusrakkude arv fenoolminimaaltassidel valemi järgi:

$$\text{Elusrakkude arv} = \frac{\text{kolooniate arv} \cdot \text{lahjendusfaktor}}{\text{agaritüki pindala tassi pindalast}}$$

Phe<sup>+</sup> reventantide tekkesagedus on arvatud nälgivas populatsioonis olevate testsüsteemi sisaldavate elusrakkude kohta.

### 2.2.9. Sekveneerimine

DNA sekveneerimiseks on kasutatud ABI Prism™ 3730xl kapillaarsekvenaatorit ning firma Applied Biosystems'i BigDye Terminator v3.1 sekveneerimiskitti. Vastavalt Jüri Pariku poolt modifitseeritud protokollile on valmistatud 10 µl reaktsioonisegu, mis sisaldab: 2 µl 5 x lahjenduspuhvrit (200 mM Tris pH 9,0; 6 mM MgCl<sub>2</sub>); 1,6 pmol praimerit; 0,7 µl premix'i (Big Dye PR-100 mix v3.1); 5-20 ng sekveneeritavat PCR-i produkti ja 3,3-4 µl H<sub>2</sub>O-d. Reaktsioon toimub 37 tsükli jooksul järgnevatel tingimustel:

- 1) 15 sekundit temperatuuril 95°C,
- 2) 10 sekundit temperatuuril 50°C,
- 3) 45 sekundit temperatuuril 60°C.

Järgnevalt on lisatud DNA sadestamiseks reaktsioonidele 2 µl dekstraani ja 30 µl 96% etanooli ning lastud proovidel sadeneda 10 minutit temperatuuril -20°C. Seejärel on tsentrifuugitud temperatuuril 4°C pööratel 16 100 g-d 10 minuti jooksul DNA sade põhja ning pestud seda 150 µl 75% etanooliga. Sade on seejärel kuivatatud temperatuuril 37°C. Kuivanud DNA sade on järgnevalt lahustatud 10 ml-s 70% formamiidis ning säilitatud temperatuuril -20°C.

### 2.2.10. Inhibitsioonikatse

Inhibitsioonitunnetuse tuvastamiseks on agarsöötmel (plaadile) külvatud pheA+C3.1 testsüsteemi sisaldava tüvest saadud Phe<sup>+</sup> mutandi rakke (~200-400 rakku plaadi kohta) koos ~1 x 10<sup>9</sup> taustarakuga (*P. putida* PaW85 rakud) või ilma taustarakkudeta fenool-minimaalplaatidele. Fenooli sisaldavatel minimaalplaatidel on võimelised kasvama vaid

fenooli lagundamist võimaldavad fenooli monooksügenaasi geeni sisaldavad Phe<sup>+</sup> rakud. Järgnevalt mõõtsime Phe<sup>+</sup> kolooniate ilmumiskiirust fenool-minimaalplaatidele päevades.

### 2.2.11. Transposoonmutagenees ja ARB-PCR (Arbitrary-PCR)

Transposoonmutageneesi läbiviimiseks on kasutatud Martinez-Garcia ja kolleegide poolt loodud sünteetilist vektorit pBam1, mis sisaldab minitransposooni (Martinez-Garcia jt, 2011). Esmalt on pBam1 vektor viidud elektroporatsiooni teel *E.coli* CC118 λpir rakkudesse, millele järgneb bakterite konjugatsioon (vt. Materjal ja metoodika, peatükk 2.2.5), kus transposooni sihtmärkrakkudeks on kasutatud *P. putida* PaW85 pheA+C3.1 tüve Phe<sup>+</sup> mutanti. Üleöö LB-1 kasvanud rakud on kraabitud plaadilt ning suspendeeritud 1 ml-s 1 x M9. Kogu suspensioon on seejärel plaaditud 40 µl kaupa fenool + kanamüstiini söötmetele koos 250 µl *P. putida* PaW85-ga. Selektiivsöötmetel, mis sisaldab Phe<sup>+</sup> kolooniate kasvuks süsinikuallikana fenooli ja transposooni transposooni insertiooni sisaldavate rakkude selekteerimiseks kanamüstiini, on võimalised kasvama vaid Phe<sup>+</sup> rakud, mis sisaldavad transposooni insertiooni. Edasi on uuritud neid Phe<sup>+</sup> kolooniaid, mis on selektiivsöötmele ilmunud varem (kolmandal või neljandal päeval) võrreldes algse PaW85 pheA+C3.1 Phe<sup>+</sup> mutandi rakkudele, kus kolooniad ilmuvad fenool-minimaalsöötmetele läbi taustarakkude kihi alles 6.-7. päeval). Transposoonmutantide kiirenenud koloonia moodustumise fenotüüpi on kontrollitud kordusplaatimisel.

Transposooni insertiooni piirkonna määramiseks *P. putida* kromosoomis on amplifitseeritud PCR abil kromosoomist piirkond, mis sisaldab inserteerunud DNA-d ja sellele külgneva ala liitjärjestust. Järgneb antud PCR produkti sekveneerimine (vt. Materjal ja metoodika, peatükk 2.2.9).

Transposooni insertioonisaadiga külgnev ala on amplifitseeritud ARB-PCR-i teel. ARB-PCR koosneb kahest etapist. Esimeses etapis tekkivate juhusliku pikkusega DNA fragmentide saamiseks on kasutatud praimereid Me-1-uus ja ARB6 (10 pmol) (tabel 2). Kõdupraimeri ARB6 3' otsas asub 5 - 6 nukleotiidi pikkune linkerregioon, mis on valitud *P. putida* kromosoomiga seondumise sageduse alusel ning on kõikidel kõdupraimeritel erinev. Järgnev 10-nt pikkune regioon sisaldab juhuslikus järjekorras kõiki nelja nukleotiidi. Kõdupraimerite 5' ots on konserveerunud, sisaldades järjestust, millega teises etapis saab seonduda praimer ARB2. ARB-PCR-i esimene etapp toimub järgmistel tingimustel: esmalt DNA denaturatsioon temperatuuril 96°C 30 sekundit, praimeri seondumine temperatuuril 30°C 30 sekundit, DNA süntees temperatuuril 72°C 1,5 minutit, kokku 6 tsüklit, sellele järgneb 30 tsüklit, kus DNA denaturatsioon toimub temperatuuril 96°C 30 sekundit, praimeri seondumine temperatuuril 45°C 30 sekundit, DNA süntees temperatuuril 72°C 2 minutit.

ARB-PCR-i teises etapis on võetud 2 µl esimeses etapis saadud PCR-i produkti ja kasutades praimereid Me-1-uus2 ja ARB2 (10 pmol) (tabel 2) on amplifitseeritud esimese etapi produkte.

Teise etapi reaktsioon toimub järgmistel tingimustel: DNA denaturatsioon temperatuuril 96°C 30 sekundit, praimeri seondumine temperatuuril 54°C 30 sekundit, DNA süntees temperatuuril 72°C 2 minutit, kokku 30 tsükli.

Sekveneerimisreaktsiooni jaoks on saadud produktidest eemaldatud kasutamata jäänud PCR-i praimerid ja desoksüribonukleotiidid. Selleks on töödeldud produkte aluselise fosfataasiga (SAP; 1 U/µl) ja eksonukleas I-ga (ExoI; 2,5 U/µl). Reaktsioon toimub temperatuuril 37°C 30 minutit ning ensüümid on seejärel inaktiveeritud temperatuuril 80°C 15 minuti jooksul. Järgnevalt on teises etapis saadud ARB-PCR-i produkte sekveneeritud (vt. Materjal ja meetodika, peatükk 2.2.9). Sekveneerimistulemused on analüüsitud Blast programmiga veebilehel [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com).

#### **2.2.12. Kolooniate eemaldamise katse**

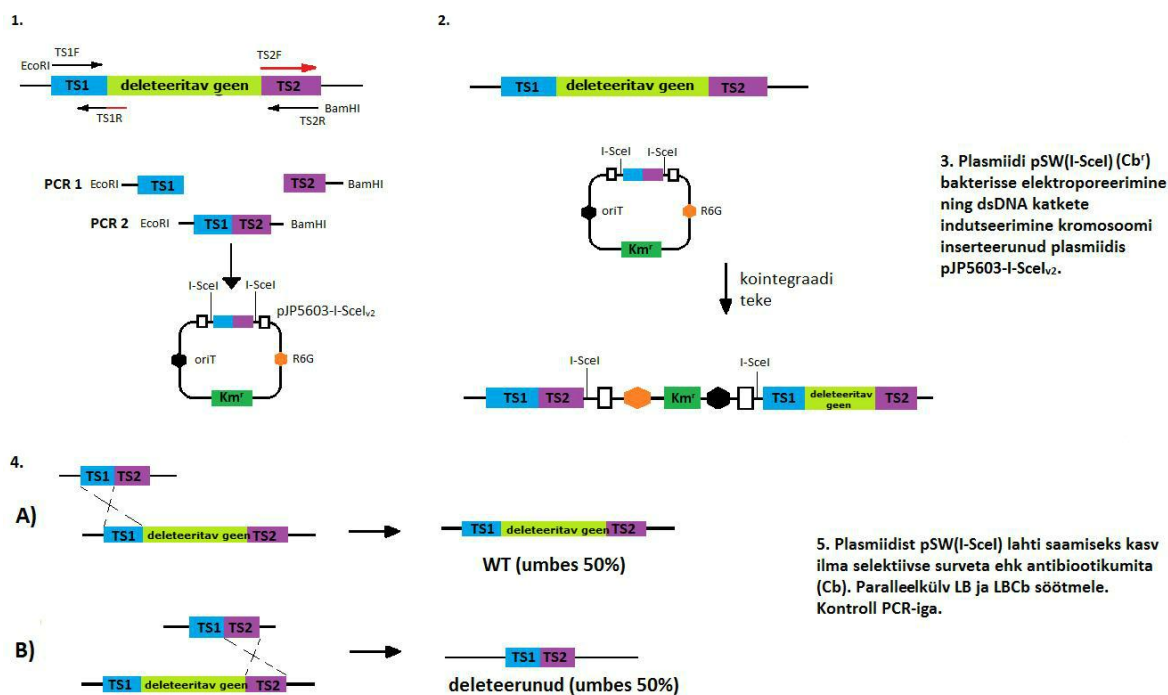
Kolooniate eemaldamise katse on Phe<sup>+</sup> mutantide akumulatsioonikatse arendus, kus tekkinud Phe<sup>+</sup> kolooniad eemaldatakse fenool-minimaalselektiivsöötmetelt koos nende all paikneva agariga. Suuremate tükkide eemaldamiseks on kasutatud skalpelli ja väiksemate jaoks peenikest metallist toru läbimõõduga ~5 mm. Iga koloonia eemaldamisele on eelnevalt steriliseeritud tarvikuid.

#### **2.2.13. Soovitud geeni deletsiooniga *P. putida* tüvede konstrueerimine**

Soovitud geeni deletsiooniga tüvede saamiseks kasutasime Podfai jt. (1999) ning Martinez-Garcia ja de Lorenzo (2011) põhjal modifitseeritud meetodit. Meetodi etapid on esitatud joonisel 4.

Mainitud tüvede saamiseks amplifitseerisime esmalt PCR-iga geeni eelse (TS1 - *target sequence* 1) ja järgse ala (TS2 - *target sequence* 2), mõlemad umbes 650 aluspaari ulatuses. Selleks kasutatavad praimerid on tabelis 2. TS1R praimer sisaldas 5' otsas TS2F praimeriga komplementaarset järjestust, et järgnevas etapis oleks võimalik TS1 ja TS2 fragmendid kokku liita. Järgmisena tegime praimeritega TS1F ja TS2R „Sewing“ PCR-i, mille jooksul toimus TS1 ja TS2 fragmentide kokkuliitmine, saades TS1TS2 fragmendi. TS1TS2 fragmendi kloonisime plasmidi pJP5603-I-SceI<sub>v2</sub> (Martinez-Garcia ja de Lorenzo, 2011), kasutades plasmidi ja fragmendi lõikamiseks firma „Fermentas“ restriktase, ning saadud plasmidi nimetasime JP. Rekombinantset plasmidi, mis sisaldas TS1TS2 insertiooni, selekteerisime *E. coli* tüves CC118λpir kanamütsiini sisaldaval söötmel. Edasi amplifitseerisime TS1TS2

fragmenti PCR-iga, kasutades primereid TS1F ja TS2R ning sekveneerisime selle kontrollimaks PCR-i käigus võimalike mutatsioonide teket TS1TS2 fragmendis. Seejärel viisime korrektset DNA järjestust sisaldava plasmidi konjugatsiooni teel bakterisse *P. putida*, kus see plasmid ei replitseeru ning plasmid inserteerub selles sisalduva TS1TS2 järjestuse ja kromosoomi vahel toimuva homoloogilise rekombinatsiooni kaudu bakteri kromosoomi. Moodustunud kointegraadiga rakke selekteerisime kanamütsiini sisaldaval söötmel, millel on võimalised kasvama ainult kointegraati sisaldavad rakud. Kointegraadi olemasolu sai kontrollitud primeritega TS1F ja TS2R. Järgnevalt viisime elektroporatsiooni abil rakkudesse I-Sce I nukleaasi ekspresseeriva plasmidi pSW(I-SceI), mis kannab karbenitsilliini resistentsusgeeni (Wong ja Mekalanos, 2000), kasutades selektsiooniks kanamütsiini ja karbenitsilliini sisaldavat LB söödet. Selleks, et indutseerida plasmidi pSW(I-SceI) poolt tekitatavaid lõikeid I-Sce I restriksioonisahtides kromosoomi integreerunud JP plasmidis, kasvasime rakke üleöö 30° C loksutil 5 ml LB-vedelsöötmes, millele lisasime karbenitsilliini (3 mg/ml). Katkete tekkimise tagajärjel on toimunud homoloogiline rekombinatsioon TS1TS2 fragmendi ja kromosoomis olevate soovitud geeni eelse TS1 või selle järgse TS2 ala vahel. Pooltel juhtudel deleteerub geen koos vektoriga ning rakk ei ole enam võimeline kanamütsiinil kasvama. Eesmärgiga isoleerida deleteerunud algse geeniga kloonid, tõmbasime 5 µl üleöö kasvanud kultuuri karbenitsilliiniga LB tassil üksikkolooniateks. Soovitud deletatsiooni toimumist bakteri kromosoomist testisime esmalt kolooniate paralleelkülviga LB tassidele, mis sisaldasid selektsiooniks kas kanamütsiini või karbenitsilliini. Seejärel kontrollisime kanamütsiini suhtes tundlikes kolooniates geeni deleteerumist PCR-iga, kasutades primereid kesk ja TS2R. pSW(I-SceI) plasmidist vabanemiseks kasvasime baktereid ilma antibiootikumita 5 ml LB-vedelsöötmes ning tõmbasime 5 µl üleöö kultuuri LB tassil üksikkolooniateks. pSW(I-SceI) kadu kontrollisime kolooniate paralleelkülviga LB ja karbenitsilliiniga LB tassidele. Karbenitsilliini tundlikke kolooniaid kontrollisime ka PCR-iga, kasutades primereid pSW-F ja pSW-R, mis peaksid plasmidi olemasolul andma produkti.



Joonis 4. Geeni deleteerimise skeem, kus on välja toodud 5 tähtsat etappi: 1) amplifitseeritav ala, praimerite seonudmis kohad ja TS1TS2 inserteerumine pJP5603-I-SceI<sub>2</sub> plasmidi; 2) PJ plasmidi viimine *P. putida* rakkudesse ja kointegraadi moodustumine; 3) plasmidi pSW viimine kointegraati ja dsDNA katkete indutseerimine; 4) homoloogilise rekombinatsiooni toimumise võimalused ja saagis; 5) pSW plasmidist vabanemine. (Joonise modifitseeris Kärt Ukkivi)

## 2.2.14. Phe<sup>+</sup> mutatsioonide tuvastamine

Tuvastamaks Phe<sup>+</sup> mutatsioone, isoleerisime phe-lacI testsüsteemi sisaldavatest rakkudest tekkinud Phe<sup>+</sup> mutantide kolooniad fenool-minimaalsöötmetelt ja kasutades PCR meetodit amplifitseerisime *lacI* geeni ja LacI operaator ala, kasutades praimereid lacopRev ja lacIloppsissel. Kombineerides nii eelnevaid, kui lacI3, lacI3out ja lacIOc2 praimereid, viisime läbi DNA sekveneerimis reaktsioonid eelpool kirjeldatud viisil. Sekveneritud DNA järjestuste võrdlemiseks on kasutatud BioEdit ja ClustalW2 programme.

## 2.2.15. Mutatsioonispektri analüüs kasutades Monte Carlo meetodit

Statistiliselt oluliste erinevuste tuvastamiseks LacI inaktivatsioonil põhinevat kromosomaalset testsüsteemi sisaldavate *P. putida* tüvede mutatsioonispektrite vahel kasutasime Monte Carlo meetodit, mis põhineb hüpergeomeetrilise testi algoritmidel (Adams ja Skopek, 1987; Piegorsch ja Bailer, 1994). Tarkvara testi (Cariello jt, 1994) tegemiseks on kättesaadaval veebiaadressil [http://www.ibiblio.org/dnam/des\\_hypg.htm](http://www.ibiblio.org/dnam/des_hypg.htm). Kõik *P*-väärtused on leitud 30 000 iteratsiooni (*iteration*) põhjal. *P*-väärtus < 0,05 viitab sellele, et paariviisilisel võrdlemisel on spektrid üksteisest statistiliselt oluliselt erinevad, kuid kuna me võrdlesime 6-



st erinevast tüvest pärit mutatsioonispektrit ja viisime läbi mitmeid paariviisilisi võrdlusi, siis tuleks rakendada Bonferroni korrigeerimist ja seega on korrigeeritud olulisuse nivoo meie andmete jaoks  $0.003 \left(0,05 / \frac{(n-1) \times n}{2}\right)$ , kus  $n$  on võrreldavate mutatsioonispektrite koguarv). Statistilist analüüsi aitas läbi viia Riho Teras.

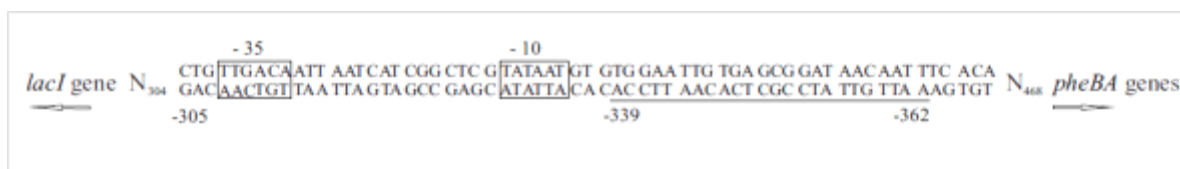
#### **2.2.16. Mutatsioonisageduste võrdlus kasutades ANOVA statistilise analüüsi meetodit ja „Tukey“ testi**

Statistiliselt oluliste erinevuste tuvastamiseks mutatsioonisageduste vahel kasutasime statistikapaketti STATISTICA 10. Tüvede mutatsioonisageduste tulemusi analüüsisime ANOVA meetodiga usaldusnivool 0,05.  $P$ -väärtused leidsime „Tukey HSD“ testiga programmis PostHoc.  $P$ -väärtus  $< 0,05$  tähendab et võrreldavate tüvede mutatsioonisagedused on üksteisest statistiliselt oluliselt erinevad. Eelnevalt oli vaja andmed viia normaaljaotusesse, selleks logaritmisime need (liitsime enne logaritmimist kõigile andmetele juurde 1 ja seda selleks, et vältida logaritmi võtmist nullist).

### 3. Tulemused

#### 3.1. Mutatsioonispektri iseloomustamine *P. putida* kromosoomi erinevates piirkondades.

Mutatsioonispektrite iseloomustamiseks valisime 6 erinevat phe-lacI tüve, millest nelja puhul oli lacI geeni transkriptsiooni suund replikatsioonikahvli liikumisega samasuunaline (tüved phe-lacI\_18, phe-lacI\_105, phe-lacI\_110, phe-lacI\_117) ning kahe tüve puhul vastassuunaline (tüved phe-lacI\_31 ja phe-lacI\_115) [tulemused on avaldatud artiklis (Juurik jt, 2012)]. Testsüsteemi lokaliseerimiseks on toodud tabelis 3. Kõik kasutatud tüved on saadud Triinu Juurikult ja nende konstrueerimiseks on *P. putida* rakkudesse viidud minitransposooni miniTn5Tet<sup>r</sup> koosseisus olev *lacI*-P<sub>tac</sub>*pheBA* geenikassett. Testsüsteemi sisaldavad rakud suudavad kasutada fenooli ainsa süsiniku allikana, kui tekib mutatsioon, mis inaktiveerib LacI repressori või tema seondumissaidi P<sub>tac</sub> promootoril (Phe<sup>+</sup> mutandid).



Joonis 5. phe-lacI testsüsteemi LacI operaatorala. P<sub>tac</sub> promootorala on ümbritsetud kastidega ja LacI operaatorala on joonitud alla. Näidatud on ka *lacI* ja *pheBA* geenide transkriptsiooni suund (Juurik jt, 2012).

Tabel 3. Kasutatud tüved ja nende lokatsioon kromosoomis. Insertiooni positsiooni järel olev nool näitab mutatsioonide märklaudgeeni *lacI* transkriptsiooni suunda kromosoomis (Juurik jt, 2012).

Tüvi	Lookus	Valk	Insertiooni positsioon
<b>Orientatsioon replikatsioonikahvli liikumisega samasuunaline</b>			
phe-lacI_18	PP_3728	Sensor histidiin kinaas/vastus regulaator	4,255,078 ←
phe-lacI_105	PP_2501	Oletatav faagi intagraas	2,848,051 →
phe-lacI_110	PP_0532	Konserveerunud hüpoteetiline valk	617,971 →
phe-lacI_117	PP_4158 (kdpD)	Sensor valk KdpD	4,699,697 ←
phe-lacI_5	PP_0340 (glnE)	Glutamaat-ammoniaak-ligaasi adenüülültransferaas	2,165,498 →
phe-lacI_19	PP_2764 (msuE)	NADH sõltuv FMN reduktaas MsuE	3,148,466 →
phe-lacI_20	PP_3379 (kguK)	Oletatav epimeraas KguE	3,824,233 ←
phe-lacI_16	PP_4624	Alfa/beeta perekonna hüdrolaas	5,249,456 →

Orientatsioon replikatsioonikahvli liikumisega erisuunaline			
phe-lacI_31	PP_4050	Glükogeeni süntaas (glgA)	4,565,560 →
phe-lacI_115	PP_3579	Konserveerunud hüpteetiline valk	4,061,029 →
phe-lacI_16	PP_4624	Alfa/beeta perekonna hüdrolaas	5,249,456 →
phe-lacI_25	PP_2556	Kromaadi transporter	2,904,590 ←
phe-lacI_30	PP_2316	ABC transporter, oletatav permeaasi valk	2,645,281 ←

Mutatsioonispektrite võrdlemiseks viisime läbi Phe<sup>+</sup> mutantide akumulatsioonikatse (vt. Materjal ja meetodika, peatükk 2.2.7) ja analüüsi võtsime Phe<sup>+</sup> mutandid, mis ilmusid selektiivplaatidele 3-7 päeva jooksul. Neil mutantidel sekveneerisime *lacI* geen ja *lac* operaator regioon (vt. Materjal ja meetodika, peatükk 2.2.9). Saadud järjestusi võrdlesime, kasutades BioEdit ja ClustalW2 programme. Sekveneerimise tulemusena tuvastasime LacI operaatorregioonis mitmeid asendusmutatsioone ning ühe nukleotiidilisi insertioone. *lacI* repressorgeenis oli mutatsioonispekter palju mitmekesisem, sisaldades erinevaid insertioone, deletsioone ning asendusmutatsioone. Kõige sagedamini detekteeritud mutatsioonideks olid *lacI*-d kodeeriva järjestuse 592 positsioonis tekkinud CTGG insertioonid või deletsioonid. Teiseks sagedamini esinevaks mutatsiooniks olid LacI operaatorala positsioonides -352 ja -351 toimunud C→T ning G→A transitsioonid. Testsüsteem võimaldas detekteerida ka IS elemendi IS1411 insertioone, mis algselt paiknes phe-lacI testsüsteemis *pheBA* geenide taga. Kõige sagedamini esinenud mutatsioonid on toodud tabelis 4. Terviklikud mutatsioonispektrid on toodud lisas 1.

Tabel 4. Sagedamini esinenud Phe<sup>+</sup> mutatsioonid erinevates phe-lacI tüvedes.

Päevad	Mutatsioon	pheA-lacI strains					
		105	110	115	117	18	31
3 - 7	-352 C→T	14	9	6	16	5	3
	-351 G→A	13	26	27	16	38	39
	221 del A	0	0	0	19	0	0
	592 ins CTGG	3	3	58	1	6	65
	592 del CTGG	12	44	3	19	37	8
	754 G→T	20	0	0	0	0	0
	IS1411	17	12	8	16	4	2
Kokku		110	112	105	127	130	130

Tuvastamaks erinevusi mutatsioonispektrites, viidi läbi statistiline analüüs Monte Carlo meetodil (vt. Materjal ja metoodika, peatükk 2.2.15), mille tulemusel selgus, et mutatsioonispektrid erinesid kõigil tüvedel (vt. lisa 5).

Üheks suurimaks erinevuseks on CTGG insertioonide ja deletsioonide esinemine positsioonis 592, mis paikneb *lacI*-d kodeerivas järjestuses. Muutused on seotud *LacI* geeni orientatsiooniga kromosoomis. Analüüsist selgus, et CTGG deletioonid esinesid eelistatult tüvedes phe-lacI\_18, phe-lacI\_105, phe-lacI\_110, phe-lacI\_117, kus *lacI* asub replikatsioonikahvli liikumisega samas orientatsioonis. Testgeeni replikatsiooni suunale vastupidises orientatsioonis sisaldavatel tüvedel (phe-lacI\_31 ja phe-lacI\_115) esines peamiselt CTGG insertioone.

*LacI* operaatoralas leidis üks „hotspot“, milleks on G-A transitsioon positsioonis -351 geeni *lacI* startkoodonist. Selle mutatsiooni esinemine varieerus sõltuvalt kromosomaalsest lokaliseerimisest. Mutatsioon moodustas 30% kõigist tüvedes phe-lacI\_18 ja phe-lacI\_31 ning 12-13% tüvedes phe-lacI\_105 ja phe-lacI\_117 tekkinud mutatsioonidest. Need erinevused olid statistiliselt olulised (vt. lisa 2). Ka C→T transitsioon positsioonis -352 varieerus teatud juhtudel (31 v 105 ja 117  $P=0,002$  vt. lisa 2)

Lisaks esines vaid teatud tüvele iseloomulikke „hotspot-e“. Üheks selliseks näiteks on phe-lacI\_117 tüves *lacI* geeni positsioonile 221 iseloomulik A deletsioon. Ainuomased on veel phe-lacI\_105-le iseloomulik G→T transversioon positsioonis 754 ja phe-lacI\_18-le iseloomulik 10 nt deletsioon positsioonis 300.

Ka IS1411 elemendi insertioonisagedus on mõjutatud testsüsteemi kromosomaalsest lokaliseerimisest. Statistiline erinevus ilmnes, kui võrrelda tüve phe-lacI\_31 tüvedega phe-lacI\_105, phe-lacI\_110, phe-lacI\_115 ja phe-lacI\_117-ga. Erinevust nähti ka tüve phe-lacI\_18 võrdluse tüvedega phe-lacI\_105, phe-lacI\_110 ja phe-lacI\_117.

Saadud tulemused kinnitavad, et lisaks mutatsioonisagedusele on ka mutatsioonispektrid mõjutatud kromosomaalsest lokaliseerimisest.

Asjaolu, et CTGG insertioonid ja deletsioonid paistavad olevat mõjutatud sellest, kas mutatsioonide märklaudgeeni transkriptsiooni suund ja replikatsioonikahvli liikumissuund on samad või erinevad, andis põhjust uurida seda efekti lähemalt, võrreldes veel kuue erinevat tüve puhul *lacI* geenis tekkinud CTGG insertioonide ja deletsioonide sagedust. CTGG insertioonide ja deletsioonide tuvastamiseks valisime tüved phe-lacI\_16, phe-lacI\_25 ja phe-lacI\_30, milles testgeen *lacI* asub replikatsioonikahvli liikumissuunaga vastupidises

orientatsioonis. Ülejäänud kolme tüve phe-lacI\_5, phe-lacI\_19 ja phe-lacI\_20 puhul olid lacI transkriptsioon ja replikatsioonikahvli liikumine samasuunalised. Testsüsteemi kromosomaalne lokaliseerimine neis tüvedes on toodud tabelis 3. Viisime läbi Phe<sup>+</sup> mutantide akumulatsioonikatse ning analüüsisime 3 ja 4 päev tekkinud Phe<sup>+</sup> mutante 592 positsioonis tekkinud CTGG insertioonide ja deletsioonide suhtes. Saadud tulemused on toodud tabelis 5.

Tabel 5. CTGG insertiooni ja deletsiooni tekke sõltuvus geeni *lacI* orientatsioonist kromosoomis. Analüüsitud on 3 ja 4 päev tekkinud kolooniaid. Tüved, milles *lacI* geen on vastupidise orientatsiooniga replikatsioonikahvli liikumise suhtes, on tabelis rasvases kirjas.

Positsioon	Mutatsioon	phe-lacI tüved					
		5	<b>16</b>	19	20	<b>25</b>	<b>30</b>
592	Ins CTGG	32	<b>35</b>	9	10	<b>39</b>	<b>35</b>
592	Del CTGG	6	<b>2</b>	26	15	<b>3</b>	<b>5</b>
Teadmata		3	<b>5</b>	11	17	<b>4</b>	<b>6</b>
Kokku analüüsitud		41	<b>42</b>	46	42	<b>46</b>	<b>46</b>

Sarnaselt eelpool saadud tulemustele selgus, et *lacI* geeni replikatsioonile vastupidise orientatsiooni puhul on eelistatud CTGG insertioonid ja samasuunalise orientatsiooni puhul deletsioonid. Kokkuvõtvalt võib väita, et CTGG insertiooni ja deletsiooni sagedused sõltuvad testgeeni *lacI* orientatsioonist replikatsioonikahvli liikumissuuna suhtes.

### 3.2. Statsionaarses faasis ja kasvavas kultuuris tekkinud Phe<sup>+</sup> mutatsioonide võrdlus.

Selleks, et uurida, kas rakkude füsioloogiline seisund (kasvavad rakud vs. Statsionaarse faasi rakud) mõjutab mutatsioonispektrit, võrdlesime erinevatel päevadel selektiivtassidele ilmunud Phe<sup>+</sup> mutantides tekkinud mutatsioone. Eeldasinme, et varasematel päevadel selektiivtassidele ilmunud Phe<sup>+</sup> kolooniate puhul on mutatsioonid tekkinud kasvavates rakkudes, hiljem ilmunud kolooniate puhul aga statsionaarse faasi rakkudes, pärast rakukultuuride plaatimist selektiivtassidele. Võrdlesime mutatsioonispektrit kolmes grupis Phe<sup>+</sup> mutantides, mis ilmusid selektiivplaatidele 3. – 4. päeval, 5. päeval ja 6. – 7. päeval. Sellisel viisil grupeeritud mutatsioonispektrid on toodud lisas 3.

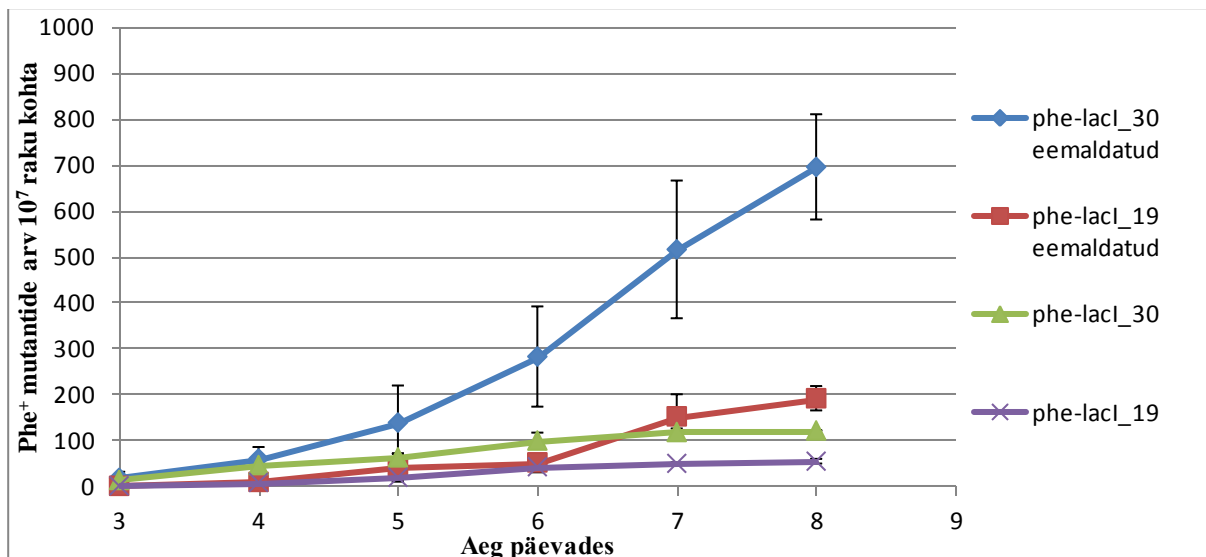
3-4 päeval isoleeritud Phe<sup>+</sup> mutantidest tekkis kõigis võrreldud tüvedes enim mutatsioone positsioonis lacI geeni positsioonis 592 CTGG deletsioonide või insertioonide näol. 6.-7. päeval isoleeritud mutantide puhul ilmnas aga kõige rohkem G→A transitsioone LacI operaatorala positsioonis -357. Triinu Juuriku poolt on varem näidatud, et täielikult

inaktiveeritud LacI repressoriga mutandid (näiteks CTGG insertiooni või deletsiooni tagajärjel tekkinud mutandid) kasvavad kiiremini, kui need, millel on operaatoralas toimunud mutatsioon, mis üksnes vähendab repressori seondumistugevust (Juurik, 2011). Samas ilmusid rekonstruktsioonikatses G→A transitsiooni sisaldava Phe<sup>+</sup> mutandi kolooniad selektiivsöötmele juba 4. päevaks. Selle põhjal võiks oletada, et G→A transitsioonid tekivad siiski eelistatult hiljem, juba statsionaarse faasi rakkudes.

### **3.3. Statsionaarse faasi mutantide akumulatsiooni pärssivad mehhanismid**

Statsionaarse faasi rakkude populatsioonis selektiivsöötmetele ilmuvate Phe<sup>+</sup> mutantide puhul on nähtud juba varem seal olevate Phe<sup>+</sup> kolooniate inhibeerivat mõju uute kolooniate ilmunisele (Saumaa jt, 2002). Selles artiklis on mutatsioonide tekkesagedust mõõdetud *P. putida mutY* defektses tüves, kuhu on viidud plasmiid promootorita *pheBA* geenikassetiga. Fenool-minimaal plaatidel suudavad kasvama hakata rakud, kus mutatsiooni tulemusena on tekkinud *pheBA* geenide ette promootor. Kuna *mutY* defektset tüve iseloomustab kõrge mutatsioonisagedus, akumulatuur plaatile kolmandaks päevaks sadu kolooniaid ja juba neljandal päeval uute kolooniate ilmumine pidurdus. Testsüsteemi sisaldavate rakkude väiksema hulga plaatimisel oli inhibeeriv efekt väiksem.

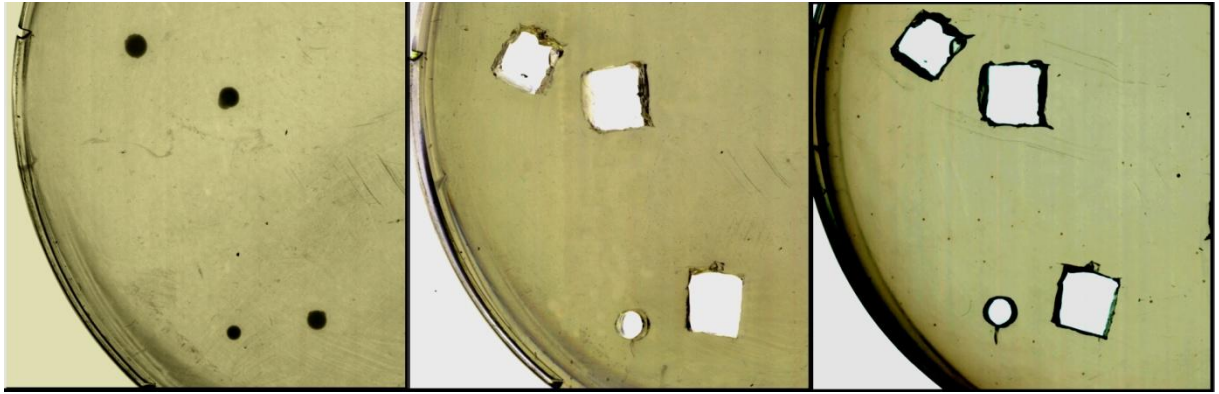
Selleks, et uurida, kas me näeme eelnevalt fenooli sisaldavatele minimaalsöötmetele ilmunud Phe<sup>+</sup> kolooniate inhibeerivat toimet uute Phe<sup>+</sup> kolooniate akumulatuurumisele ka kromosomaalsete testsüsteemide puhul, viisime läbi katsed kromosomaalset testsüsteemi *lacI-P<sub>tac</sub>pheBA* sisaldavate tüvede *phe-lacI<sub>19</sub>* ja *phe-lacI<sub>30</sub>* puhul, mis erinevad teineteisest testsüsteemi lokaliseerimise poolest. *phe-lacI<sub>19</sub>* tüves asub testsüsteem geen *PP<sub>2764</sub>* (*msuE*), mis kodeerib NADH sõltuvat FMN reduktaasi MsuE. *phe-lacI<sub>30</sub>* tüves asub testsüsteem hüpoteetilist valku kodeerivas geen *PP<sub>2316</sub>* (Juurik, 2011). Need tüved valisime välja põhjusel, et nende puhul olid Phe<sup>+</sup> mutantide tekkesagedustes kõige suuremad erinevused. Viisime läbi akumulatsioonikatse, kus pooltelt selektiivplaatidelt plaatidelt eemaldasime iga päev sinna tekkinud Phe<sup>+</sup> kolooniad. Plaatisime umbes  $1 \times 10^7$  testsüsteemiga rakku koos  $1 \times 10^9$  taustarakuga (PaW85) fenool-minimaal plaatidele ja võrdlesime Phe<sup>+</sup> kolooniate arvu söötmetel, kus iga päev uued kolooniad eemaldati, kolooniate arvuga söötmetel, kus kolooniaid ei eemaldatud. Kolooniad eemaldati kuni viienda päevani, edasi eemaldati vaid suuremad, kuna uusi kolooniaid tuli plaatidele tihedalt (vt. Materjal ja meetodika, peatükk 2.2.12). Saadud tulemused on toodud joonisel 6.



Joonis 6. Akumulatsioonikatse, kus pooltelt tassidelt eemaldati kolooniad. Igal järgneval päeval tekkinud kolooniate arv on liidetud eelneva perioodi jooksul tekkinud kolooniate summale. 8. päeval esitatud  $\text{Phe}^+$  kolooniate arv on kogu katseperioodil tekkinud kolooniate summa.  $\text{Phe}^+$  kolooniate hulk on arvestatud  $1 \times 10^7$  testsüsteemi sisaldava raku kohta. Joonisel on esitatud vähemalt 18 sõltumatu katse keskmised tulemused ja 95% usalduspiir.

Nagu joonisel on näha, soodustab  $\text{Phe}^+$  kolooniate eemaldamine uute teket. Seitsmendaks päevaks oli tassidel sadu kolooniaid ja joonisel toodu on pigem hinnang. Samal ajal ilmus plaatidele, kust kolooniaid ei eemaldatud,  $\text{Phe}^+$  mutante kordades vähem.

Kirjeldatud fenomeni puhul jäi võimalus,  $\text{Phe}^+$  mutantide akumulatsioon selektiivtassidele pidurdus fenooli kontsentratsiooni vähenemise tõttu. Fenooli limitatsiooni välistamiseks viisime läbi uue akumulatsioonikatse, kus eemaldasime alles kaheksandal päeval kõik selleks ajaks söötmele tekkinud kolooniad. Pärast kolooniate eemaldamist tekkis järgmistel päevadel kõigile selektiivtassidele ligikaudu sadakond väikest kolooniat, mis näitab, varem söötmele ilmunud kolooniate inhibeeriv toime uute  $\text{Phe}^+$  mutantide ilmunisele ei olnud tingitud fenooli kui süsinikuallika limitatsioonist (vt. joonis 7). Lisaks viitavad need tulemused sellele, et söötmel olnud  $\text{Phe}^+$  kolooniate poolt produtseeritud on ebastabiilsed.

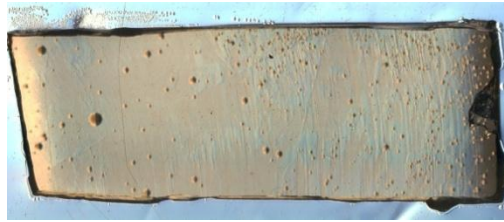


Joonis 7. Kolooniate eemaldamise katse. Esimesel pildil on Phe<sup>+</sup> kolooniate akumulatsioon toimunud 8 päeva. Suuremad kolooniad lõigati välja skalpelliga, väiksem eemaldustoruga. Eemalduse järgselt on tehtud pilt 2. Kolmas pilt on tehtud 3 päeva hiljem ja seal paistab ~20 väikest kolooniat.

Välistasime ka võimaluse, et kolooniate tekkesageduse suurenemine on eemaldusprotsessi artefakt. Selleks külvasime fenool-minimaaltassidele Phe<sup>+</sup> rakke ja eemaldasime pärast kolmepäevast inkubeerimist kasvama hakanud rakud skalpelli ja eemaldustoruga. Järgnes kolmepäevane inkubeerimine, mille tulemusel ilmnnes mõningatel juhudel kasv lõike ümbruses, seda eriti niiskemate tasside puhul. Samas kuivematel tassidel me kolooniate ilmumist ei näinud ja seega polnud tegu antud meetodist tingitud artefaktiga.

Eeldusel, et uute kolooniate moodustumist inhibeerivad juba tekkinud kolooniad, eemaldasime akumulatsiooniplaatidelt kolooniateta agaritükke ning inkubeerisime neid uutel fenool-minimaal plaatidel. Uutel plaatidel tekkis järgmiseks päevaks ümber tõstetud agari pinnale hulgaliselt Phe<sup>+</sup> mutante, kusjuures kolooniad suutsid kasvada teineteisele palju lähemal, kui eelnevate katsete puhul (vt. joonis 8). Samas sel juhul, kui inkubeerisime eemaldatud agaritükke Petri tassil ilma söötmeta, tekkis kolooniaid tunduvalt vähem ja nad olid palju väiksemad. See erinevus kolooniate arvus ja suuruses võis olla tingitud kiiresti vähenevast niiskuse tasemest agaritükis või oli põhjus siiski ka vähenenud fenooli kontsentratsioonis. Lisaks on veel kolmas võimalus, et Phe<sup>+</sup> kolooniad ning ka söötmel olevad taustarakud produtseerivad erinevaid inhibiitoreid, millest mingi fraktsioon on stabiilsem. Kui viisime agaritüki värsketele fenool-minimaalsöötmele, difundeerusid alles jäänud inhibiitorid agaritüki all olevasse söötmesse.





Joonis 8. Kolooniateta agaritüki inkubeerimine värskel fenool-minimaal tassil. Järgmistel päevadel ilmus sinna sadu kolooniaid.

### 3.4. Taustarakkude inhibeeriva mõju uurimine $Phe^+$ kolooniate kasvule.

Lisaks juba kasvavatest kolooniatest difundeeruvatele inhibiitoritele aeglustavad  $Phe^+$  rakkude kasvu ka söötmel olevad taustarakud. Näiteks kui külvata fenooli lagundavad *P. putida* rakud, mis sisaldavad konstitutiivselt töötava promootori taha kloonitud *pheA* geeni mõõduka koopiaarvuga plasmiidis pKT240, ilmuvad  $Phe^+$  kolooniad fenool-minimaaltassidele juba järgmiseks päevaks. Kui  $Phe^+$  rakud on aga segatud taustarakkudega ( $1 \times 10^9$  taustarakku, kuhu on lisatud ligikaudu 100  $Phe^+$  rakku), siis ilmuvad  $Phe^+$  kolooniad nähtavale alles teisel päeval pärast plaatimist. Taustarakkude inhibeeriv või kasvu aeglustav mõju fenooli lagundavatele bakteritele ilmneb tugevamalt siis, kui *pheA* geeni ekspressioonitase on madalam.

Taustarakkude  $Phe^+$  kolooniate kasvu inhibeeriva mõju täpsemaks uurimiseks valisime *P. putida* tüve *pheA*+C 3.1 baasil tekkinud  $Phe^+$  mutandi  $PheA^+$ . Antud  $PheA^+$  tüvi on väga tundlik taustarakkude poolt põhjustatud kasvu inhibitsioonile fenool-minimaaltassidel. Kui plaatida  $PheA^+$  tüve rakke fenool-minimaal söötmetele ilma taustata, on  $Phe^+$  kolooniaid näha juba järgmisel päeval pärast plaatimist, kuid koos taustarakkudega plaatimisel ilmuvad väiksed kolooniad viiendal päeval ning kuuendal on näha normaalse suurusega kolooniaid. Kolooniate tekkimine võib varieeruda viienda ja kuuenda päeva vahel, mis võib olla tingitud taustarakkude tihedusest või plaaditud rakkude füsioloogilisest seisundist.

Välistamaks geenikasseti kromosomaalsest lokalisatsioonist tingitud kasvufekte, tuli esmalt määrata inserteerumisaht ja selleks kasutati ARB-PCR meetodit (vt. Materjal ja meetoodika, peatükk 2.2.11), mille esimeses etapis kasutati praimereid: ARB6 ja Smsaba ning teises etapis: ARB2 ja SmSplõpp. Amplifitseeritud DNA sekveneeriti (vt. Materjal ja meetoodika, peatükk 2.2.9) ja saadud DNA järjestuse asukoht määrati, kasutades [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com) leheküljel olevat Blast programmi.  $PheA^+$  tüves oli *pheA*+C geenikasset inserteerunud *P. putida* genoomi positsiooni 87557. Insertioonikoht asub geenis PP\_0076, mis kodeerib ABC tüüpi transportersüsteemi kuuluvat periplasmaatilist

glütsiin/betaiin seonduvat valku. Kuigi aminohapete transpordil on raku elus tähtis roll, ei tohiks antud töös uuritav fenotüüp olla seotud selle lokalisatsiooniga. Nimelt on Triinu Juuriku töös toodud veel mitmeid erinevate lokalisatsioonidega pheA+C tüvede baasil saadud Phe<sup>+</sup> mutante, mille kolooniad ilmuvad fenool-minimaaltassidele läbi taustarakkude kihi alles viiendaks-kuuendaks päevaks (Juurik, 2011).

Järgnevalt uurisime, kas PheA<sup>+</sup> rakkude kasvu inhibeerivad signaalid on liigispetsiifilised või tunnetavad bakterid ka teistelt liikide poolt produtseeritud inhibiitoreid. Selleks viisime läbi inhibitsioonikatse seitsme erineva taustaga (vt. tabel 6).

Tabel 6. Inhibitsioonikatse tulemused. PheA<sup>+</sup> tüve kolooniate ilmumine fenool-minimaaltassidele koos erinevate taustadega ja ilma.

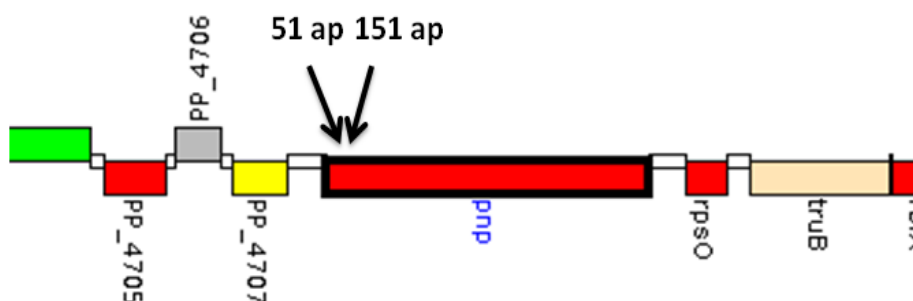
Tüved:	Kolooniad tekivad:
PheA <sup>+</sup> ilma taustata	1p
PheA <sup>+</sup> koos <i>P. putida</i> PaW85 rakkudega	6p
PheA <sup>+</sup> koos <i>E. coli</i> HB 101 rakkudega	1p
PheA <sup>+</sup> koos <i>E. coli</i> MG 1655 rakkudega	1p
PheA <sup>+</sup> koos <i>P. fluorescens</i> rakkudega	3p
PheA <sup>+</sup> koos <i>P. aeruginosa</i> PAO1 rakkudega	3p
PheA <sup>+</sup> koos <i>P. fragi</i> rakkudega	3p
PheA <sup>+</sup> koos <i>P. syringae</i> rakkudega	2p

Nagu tabelist 6 näha, on inhibitsiooni efekt tunduvalt suurem lähedastel liikidel ja tugevaim liigisiselt. *E. coli* erinevad tüved ei omanud mingit inhibeerivat efekti Phe<sup>+</sup> kolooniate tekkele.

### 3.5. Inhibitsiooni tekitavate geenide tuvastamine

Inhibitsiooni võimalike mehhanismide uurimiseks viisime läbi *P. putida* pheA-C 3.1 baasil saadud PheA<sup>+</sup> tüve transposoonmutageneesi (vt. Materjal ja meetodika, peatükk 2.2.11). Otsisime geene, mille katkestamine transposooniga toob kaasa inhibitsiooniefekti kadumise. Uurisime transposooni insertiooni sisaldavaid Phe<sup>+</sup> kolooniaid, mis suutsid hakata läbi tausta kasvama kolmandal või neljandal päeval. Transposoonmutageneesil saadud kolooniatel kontrollisime inhibitsioonitunnetuse kadumist kordusplaatimisel nii taustaga kui ilma. Selgus, et paljudel transposoonmutantidel (Tn) on inhibitsioonitunnetus langenud, ning kolooniad ilmuvad nähtavale juba kolmandaks päevaks. Geenide leidmiseks, kuhu

transposoon on sisenenud, kasutasime ARB-PCR ning amplifitseeritud ala sekveneerisime. Kokku leidsime 103 erinevat geeni, kuhu oli toimunud insertioon (andmed ei ole esitatud). Edasi tegelesime ainult nende geenidega, kuhu insertioon oli toimunud rohkem kui ühel korral. Kaks korda oli insertioon samasse geeni toimunud kahe geeni PP\_3584 ja PP\_4708 puhul. Geenilt PP\_3584 kodeeritakse transmembraanset RND transporter valku ja geenilt PP\_4708 (*pnp*) polünukleotiidi forsorülaasi PNP. PNP funktsiooniks peetakse RNA degradatsiooni. Näitamaks leitud geenide osalust inhibitsiooni tunnetuses, oli meil plaanis need geenid deleteerida PheA<sup>+</sup> tüves, kasutades I-SceI nukleaasi homologilise rekombinatsiooni indutseermiseks (vt. Materjal ja meetodika, peatükk 2.2.13.). Antud meetodil ebaõnnestus *pnp* geeni deleteerimine. Lähemal vaatlemisel selgus, et mõlemad insertioonid olid toimunud *pnp* geeni lõppu (51 ja 151 ap geeni lõpust) (vt. joonis 9).



Joonis 9. Transposooni insertiooni saidid *pnp* geeni

Kuigi *P. putida*-le eluks vajalike geenide andmebaase ei ole, saab paralleelsele tuua *P. aeruginosa* transposoonmutantide kogust, kus *pnp* geenile on näidatud ainult ühte insertiooni 151 ap kaugusel geeni lõpust ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)). Kuna tegemist on suure geeniga (2105 ap), millesse on insertioonid toimunud ainult lõppu, viitab see ülejäänud geeni eluks vajalikule rollile. *pnp* 701 aminohappe järjestuse lähemal uurimisel InterProScan programmiga selgus, et insertioonid on toimunud RNA-ga seondumise domeeni.

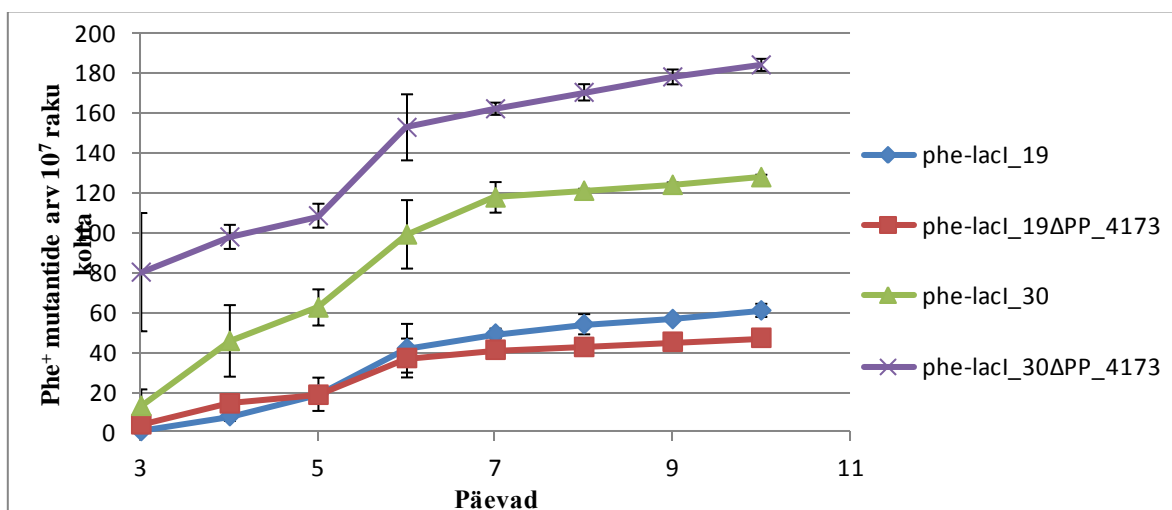
Geeni PP\_3584 puhul õnnestus meil saada deletsioonmutant. Saadud PheA<sup>+</sup>ΔPP\_3584 tüvega viisime läbi inhibitsioonikatse taustarakkudega ning selgus, et PP\_3584 deleteerimine ei toonud kaasa inhibitsioonitunnetuse vähenemist.

Lisaks eelpool uuritud geenidele deleteerisime veel ühe transposoonmutageneesiga välja tulnud geeni, millesse oli transposoon inserteerunud vaid korra. PP\_4173 kodeerib hübriidset membraanseoselist sensor histidiinikinaasi, mis kuulub kahekomponendilisse signaalsüsteemi. Selle geeni puhul oli transposooni insertioon toimunud lokaliseerimise 4716620, olles 80 ap kaugusel PP\_4173 geeni lõpust. InterProScan tulemusel asub insertioon

CheY sarnases vastuse regulaator domeenis. PP\_4173 geeni deletsiooni tulemusel selgus, et PheA<sup>+</sup>ΔPP\_4173 tüvel on taustaga plaadituna inhibitsioonitunnetus hoopis tõusnud. Väiksed kolooniad olid suutelised tekkima alles 7 või 8 päeval, kuid taustata plaadituna olid kolooniaid ikka näha juba järgmisel päeval.

### 3.6. PP\_4173 deletsiooni mõju Phe<sup>+</sup> mutantide tekkele

Kuna eelpool kirjeldatud katsetes nägime PP\_4173 deletsiooni suurendavat mõju inhibitsioonitunnetusele, otsustasime uurida, kas bakterite suurenenud inhibitsioonitunnetus mõjutab ka mutatsiooniprotsesse kromosoomis. Deleteerisime antud geeni tüvedes phe-lacI\_19 ja phe-lacI\_30 ja võrdlesime Phe<sup>+</sup> mutantide tekkesagedusi deletsiooniga ja deletsioonita tüvedes. Katse tulemused on toodud joonisel 9 ja lisas 7.



Joonis 10. Phe<sup>+</sup> kolooniate akumulatsioon fenool-minimaaltsassidel. Igal järgneval päeval tekkinud kolooniate arv on liidetud eelneva perioodi jooksul tekkinud kolooniate summale. 10. päeval esitatud Phe<sup>+</sup> kolooniate arv on kogu katseperioodil tekkinud kolooniate summa. Phe<sup>+</sup> kolooniate hulk on arvestatud 1 x 10<sup>7</sup> elusraku kohta. Joonisel on esitatud kolme katse vähemalt 28 sõltumatu paralleeli keskmised tulemused ja 95% usalduspiirid.

Jooniselt 10 on tüvede phe-lacI\_19 ja phe-lacI\_19ΔPP\_4173 võrdlusest näha, et PP\_4173 geeni deleteerimine ei mõjuta Phe<sup>+</sup> mutantide tekkesagedust. Samas ilmnes statistiliselt oluline erinevus Phe<sup>+</sup> kolooniate tekkes, kui võrdlesime phe-lacI\_30 ja selle PP\_4173 deletsiooniga varianti. Erinevus ilmnes kolmandaks päevaks selektiivsöötmel ilmunud Phe<sup>+</sup> mutantide arvus. Saadud tulemused viitavad sellele, et geeni PP\_4173 deleteerimine mõjutab mutatsioonisagedust sõltuvalt vaadeldavate mutatsioonide kromosomaalsest lokaliseerimisest.

## 4. Arutelu

Käesolevas töös uurisime kromosomaalse lokaliseerimise mõju mutatsiooniprotsessidele, kasutades selleks testsüsteemi *lacI*-P<sub>tac</sub>*pheBA*, mis võimaldab tuvastada erinevat tüüpi mutatsioone *lacI* geenis ja LacI repressori seondumisasal (asendusmutatsioonid, raaminihked, suuremad deletsioonid ja insertioonid). Nägime, et juhul kui võrrelda LacI-d inaktiveerivate mutatsioonide spektrit tüvedes, kus sama mutatsioonide märklaud asub kromosoomi erinevates piirkondades, ilmnevad mutatsioonispektris olulised erinevused. Kuna mutatsioonide märklaud oli kõikidel juhtudel sama, siis pidid erinevused mutatsioonispektrites olema seotud regionaalsete efektidega. Nende põhjustele ühtset selgitust ei pruugi eksisteerida.

### 4.1 Enim tuvastatud mutatsioonide võimalikud põhjused

Kõige sagedamini tuvastatud mutatsioonid on seotud nelja aluspaariste insertioonide või deletsioonidega. Selliste muutuste teket soodustavad *lacI* geeni postitsioonis 592 kuni 604 tandemina asetsvad CTGG järjestused (neid on kolm). Kokku uurisime antud positsiooni tekkinud mutatsioone kaheistkümnelt erineva lokaliseerimise puhul, millest 7 juhul ühtis *lacI* geeni transkriptsiooni suund replisoomi liikumise suunaga kromosoomis (CTGG kordusjärjestuse matriits asus mahajääval ahelal) ja 5 juhul olid *lacI* geeni transkriptsiooni suund ja replisoomi liikumise suund kromosoomis vastupidised (CTGG kordusjärjestuse matriits asus juhtival ahelal). Analüüsil selgus, et CTGG insertioonid tekivad eelistatult siis, kui CTGG matriits asub juhtival ahelal (erines vaid tüvi phe-*lacI*<sub>5</sub>), deletsioonid peamiselt aga siis, kui CTGG matriits asus mahajääval ahelal. Samast sagedast deletsioonide ja insertioonide teket on varem uuritud bakteris *E. coli*, kus mutatsioonide märklauaks oli tandemina esinev CTG järjestus. Ka sel juhul leiti antud mutatsioonide tekkel seos replikatsioonikahvli liikumise suunaga sihtmärkjärjestuse suhtes, kus deletsioonid tekkisid eelistatult CTG matriitsi asumisel mahajäävas ahelas ja insertioonid siis, kui CTG matriits asus juhtivas ahelas (Streisinger ja Owen, 1985; Bharatan jt, 2004). Tandemina paiknevate järjestuste arvu muutumist seostatakse DNA replikatsiooniprotsessi asümmeetrilisusega, kus kumbagi ahelat replitseeritakse erinevalt. Kui juhiva ahela replitseerumine toimub pidevalt, siis mahajäävat ahelat sünteesitakse lühikeste Okazaki fragmentidena. Selline protsess võimaldab sekundaarstruktuuride moodustumist, mis soodustab DNA polümeraasi libisemist, tuues kaasa insertioone või deletsioone sünteesitavasse ahelasse (Kang jt, 1995). Insertioonide ja deletsioonide tekkel CTGG

kordustelt *lacI* geenis bakteri *E. coli* puhul on arvatud, et lisaks libisemisele CTGG kordusjärjestustel võib libisemisi tekkida ka muude järjestuste baasil (Schaaper jt, 1986).

Minu katsetes saadud mutatsioonispektrite analüüsist selgus, et varakult selektiivsöötmetele ilmuvate Phe<sup>+</sup> kolooniate seas (ilmusid 3. ja 4. päeval) olid kõige sagedamini esindatud CTGG deletsioonid ja insertsioonid *lacI* geeni 592 positsioonis ning hilisematel päevadel (6. ja 7. päeval) domineerisid asendusmutatsioonid (vt lisa 3). Üheks sagedasemaks oli LacI operaatorjärjetuse positsioonis -351 tekkinud G → A transitsioon. Sellist mutatsiooni sisaldavatel Phe<sup>+</sup> fenotüübiga rakkudel kulub taustaga plaadituna koloonia moodustamiseks neli päeva, CTGG deletsiooni sisaldavatel mutantidel aga kolm. Aeglasem kasv võib selgitada G → A mutatsiooni sisaldavate Phe<sup>+</sup> kolooniate ilmunist selektiivsöötmetele hilisematel päevadel. Kuna aga enamus neist ilmusid alles 6. ja 7. päeval, seega 2-3 päeva hiljem kui rekonstruktsioonikatsetes, siis selle põhjal arvame, et sellised G → A transitsioonid tekivad eelistatult siiski statsionaarse faasi rakkudes. Erinevusi statsionaarse faasi ja kasvavate rakkude mutatsioonispektrites on nähtud ka varasemates töödes nii meie laboris plasmiidsete testsüsteemide puhul (Kasak jt, 1997; Saumaa jt, 2002) kui ka teistes laborites *E. coli* tüves FC40 F plasmiidis asuva *lac* alleeli puhul (Cairns ja Foster, 1991; Foster ja Trimarchi, 1994; Rosenberg jt, 1994). Lisaks suutsime tuvastada mutatsioone, mis on iseloomulikud ainult 3. ja 4. päeval selektiivsöötmetele ilmunud Phe<sup>+</sup> kolooniatele. Nii nägime *lacI* geenis kahte A nukleotiidi deletsiooni positsioonis 221 ja G → T transversiooni positsioonis 754 vaid esimestel päevadel ilmunud kolooniate puhul, kuid mitte hiljem.

## 4.2. Transposooni *IS1411* insertisoonisageduse varieeruvus piirkonniti

Saadud tulemused näitavad, et IS elemendi *IS1411* transponeerumise sagedus varieerub samuti *P. putida* kromosoomi eri piirkondades. *IS1411* paiknes kromosoomi viidud testsüsteemis *pheBA* geenide taga ja tema inserteerumine *lacI* geeni inaktiveeris LacI repressori. Transponeerumise sagedust võidakse reguleerida mitmeti. Kaitsmaks genoomi potentsiaalselt kahjulike mutatsioonide eest, on transposoonide liikumine kromosoomis alla reguleeritud. Regulatsioon toimub nii transposooni kui ka peremesorganismi poolt poolt kodeeritud faktorite kaudu (Duval-Valentin ja Chandler, 2011). *IS1411* transpositsiooni regulatsiooni kohta on vähe teada, kuid meie labori tulemuste põhjal on leitud, et transponeerumine toimub läbi tsirkulaarse vahevormi. Tõenäoliselt toimub transponeerumine replikatiivselt, kuna element on jäänud alati ka oma algsesse lokalisatsiooni (Kallastu jt, 1998). Transponeerumise sagedus suureneb järsult *P. putida* nälgivates rakkudes, milles on

inaktiveeritud statsionaarse faasi sigma faktori geen *rpoS*, mis viitab sellele, et RpoS represserib *IS1411* transponeerumist. Kuigi varasemad uuringud viitasid sellele, et *IS1411* transponeerumiseks on vaja mingit hilist nälgimissignaali (Saumaa jt, 2002), siis minu töö puhul oleme tuvastanud selle IS elemendi transponeerumist nii varem kui ka hiljem ilmunud Phe<sup>+</sup> kolooniate puhul (vt. lisa 3). Teisalt oli aga ka kromosoomis piirkondi (*phe-lacI*\_105 - 2,848,051 ja *phe-lacI*\_117 - 4,699,697), kus *IS1411* inserteerumisi tuvastame peamiselt hiljem tekkinud Phe<sup>+</sup> mutantidest. Transponeerumise sageduse varieerumine erinevates kromosoomi piirkondades viitab võimalikele nukleoidi voltumise tasemest tingitud efektidele. Nukleoidi struktureerumine toimub mitmel tasemel ja on suunatud nii nukleoid-seonudvate valkude (NAP - *Nucleoid-Associated Proteins*) kui topoisomeraaside vahendatud superspiralatsiooni kaudu (Travers ja Muskhelishvili, 2005; Dillon ja Dorman, 2010). Teadaolevalt mõjutab DNA pakkumise tase osade transposoonide liikumist. Näiteks Tn5 vajab transponeerumiseks negatiivselt superspiraliseerunud sihtmärk DNA-d (Isberg ja Syvanen, 1982). Selline muutus DNA-s võib mõjutada ka *IS1411* transponeerumise sagedust erinevates kromosoomi piirkondades.

#### 4.3. Statsionaarse faasi akumulatsioon

Statsionaarse faasi mutatsiooniprotsesside uurimisel on tuvastatud varem selektiivsöötmele tekkinud Phe<sup>+</sup> kolooniate inhibeeriv mõju uute kolooniate ilmunisele (Saumaa jt, 2002). Sama efekt ilmnis ka minu töös, kus samasugune inhibitsioon, mida varem oli nähtud plasmiidse testsüsteemiga, ilmnis kromosomaalse testsüsteemi puhul tekkivate Phe<sup>+</sup> mutantidega. Nägime, et selektiivsöötmetelt sinna iga päev ilmunud Phe<sup>+</sup> kolooniate eemaldamisel ilmus selektiivsöötmele järgmistel päevadel tunduvalt rohkem uusi kolooniaid, kui siis, kui kolooniaid ei eemaldatud (joonis 6). Selgus, et potentsiaalseid rakke, mis suudaksid fenoolil kasvada, on tunduvalt enam, kui tuvastasime akumulatsioonikatesetes. Kuna rakud ei sure, on tõenäoliselt tegemist bakteriostaatilise efektiga. Ilmselt tekib pidevalt mutatsioone, mis võimaldavad fenooli lagundamist, kuid sellele vaatamata on kolooniate moodustumine takistatud. Sellisele võimalusele viitab suure hulga uute Phe<sup>+</sup> kolooniate ilmumine fenool-minimaal plaatidele pärast seda, kui sealt on korraga eemaldatud mitme päeva jooksul akumulunud Phe<sup>+</sup> kolooniad. Seda järeldust toetavad ka katsetulemused, kus nägime kolooniate vahelt lõigatud agaritükkide inkubeerimisel uutel plaatidel Phe<sup>+</sup> kolooniate massilist moodustumist. Uutel fenool-minimaal plaatidel suutsid agari tüki pinnal paiknevad rakud moodustada suuremaid ja tunduvalt tihedamalt paiknevaid kolooniaid kui plaatidel,

kust eemaldasime tekkinud Phe<sup>+</sup> mutandid. Kuigi see võib olla tingitud suuremast fenooli hulgast, pole ka välistatud võimalike inhibeerivate signaalide diffundeerimine agari tüki all paiknevasse söötmesse.

Akumulatsioonikatses esinevate vastastikmõjude uurimisel ei saa unustada rakkude olemasolu, mis suudavad inhibeerivaid signaale eirates kolooniaid moodustada. Eelnev tekitab mitmeid küsimusi akumulatsioonikatsetes saadud tulemuste kohta. Kas inhibeeriv efekt tekitab lisaselektsiooni? Samuti tekib käesoleva töö puhul küsimus, kas juba kasvavate Phe<sup>+</sup> kolooniate poolt produtseeritud inhibiitorid suruvad maha ainult uute Phe<sup>+</sup> mutantide kasvama hakkamise ja kolooniate moodustumise, või mõjutavad inhibitsioonisignaalid ka rakus toimuvaid protsesse, mis on seotud mutatsioonide tekkega. Praeguste katsetulemuste põhjal on seda raske öelda. Siin oleks vaja lisakatseid, kus on näiteks võrreldud mutatsioonispektrit Phe<sup>+</sup> mutantide puhul, kus inhibeerivad kolooniad on pidevalt eemaldatud, mutatsioonispektriga, kus inhibeerivad kolooniad jäetakse alles. Juhul, kui näeksime erinevusi mutatsioonispektris, viitaks see erinevustele mutatsiooniprotsessides. Siiski on meil üks huvitav tulemus, mille saime Phe<sup>+</sup> kolooniate vahelt välja lõigatud agaritükkidelt rakkude mahapesemisega. Lähtudes katsetulemustest, kus agaritüki uuele fenooli sisaldavale minimaalsöötmele viimisel hakkas seal kasvama sadu Phe<sup>+</sup> kolooniaid (joonis 8) ja eeldades, et kõigi pärast agaritüki ümbertõstmist kasvama hakanud kolooniate puhul olid Phe<sup>+</sup> rakud algselt juba olemas, oleksime me pidanud ka rakkude mahapesemise katsetes saama ligikaudu samal hulgal Phe<sup>+</sup> kolooniaid. Tegelikult nägime agarilt mahapestud rakkude puhul vaid paari Phe<sup>+</sup> kolooniat (andmed ei ole esitatud). Isegi kui osa rakke mahapesemisel kaotsi läks, oli kasvama hakanud kolooniate hulk ikkagi oodatust väiksem. Seega viitavad need tulemused intrigeerivale võimalusele, et juba kasvama hakanud rakkude poolt produtseeritud inhibiitorid mitte ainult ei pärsi teiste rakkude (antud juhul hiljem tekkinud Phe<sup>+</sup> mutantide) kasvu, vaid pärsivad ka mutatsiooniprotsesse.

Nagu magistritöö kirjanduse ülevaate osas on tutvustatud, esineb bakteritel mitmeid kvoorumtunnetuse signaale, mille kaudu nad ümbritsevat tajuvad ja mis toimivad sõltuvalt signaalmolekuli kontsentratsioonist. Seda arvesse võttes on keeruline seletada, kuidas näiteks kaheksandaks päevaks selektiivtassile tekkinud 10 kolooniat suudavad inhibeerida ülejäänud mutantide teket terve plaadi ulatuses. QS signaalide kahjuks räägib ka *P. putida*-ga läbiviidud katse, kus on näidatud AHL signaalide madalat difundeerumise ulatust (kui mitte arvestada rakkude enda suurust: ~ 2 µm) (Hwang jt, 2008). Taime pinnal oli kaugeim signaal, mida suudeti detekteerida 78 µm ning enamus signaale levisid ainult 10 µm kaugusele (Gantner jt, 2006). Teisalt pole välistatud molekulid, mis erinevatel matriksitel suudavad kanda signaale



kaugemale (Decho jt, 2010). Lihtsaim viis signaali levitamiseks oleks läbi lenduvate ühendite, kuid selliseid signaale pole teadaolevalt kirjeldatud (neid on ka raske identifitseerida). Meie katsete põhjal tundub, et tajutavad signaalid on üpris ebastabiilsed, kuna neid produtseerivate Phe<sup>+</sup> mutantide eemaldamisel suudavad uued kolooniad moodustuda samale söötmele juba järgmiseks päevaks.

Akumulatsioonikatses pidurdavad kolooniate moodustumist lisaks varem tekkinud Phe<sup>+</sup> mutantide kolooniatele ka taustana plaaditud *P. putida* PaW85 rakud. Meie katsetest ilmnes, et pidurdav efekt on kõige tugevam just liigisiselt, mis viitab spetsiifilistele keskkonda sekreteeritavatele signaalidele. Varem on näidatud liigisiseseid inhibeerivaid efekte *E. coli* tüvel EC93, mis peatas teiste tüvede kasvu kontaktsõltuva mehhanismi kaudu (Slechta ja Mulvey, 2006). *P. putida*-l selliseid mehhanisme leitud ei ole.

Kuigi transposoonmutageneesi tulemusel leidsime mutante, kus inhibitsioonitunnetus taustarakkude osas oli oluliselt vähenenud (Phe<sup>+</sup> kolooniad ilmusid fenool-minimaalsöötmele läbi taustarakkude kihi 3-4 päeva varem), ei ole meil siiani õnnestunud transposooni insertioone sisaldavate geenide algses tüves deleteerimisega saada vähenenud inhibitsioonitunnetusega tüvesid. Praeguseks on katsetatud ka ainult väheste geenidega. Inhibitsioonitunnetuse kaotanud transposooni insertiooni sisaldavates kolooniates oli transposoon korduvalt samasse geeni inserteerunud ainult kahe geeni puhul. Need geenid (PP\_3584 ja PP\_4708) valisimegi deletsioonmutantide tegemiseks. Eesmärgiks oli deleteerida terved geenid, kuhu insertioon on toimunud enam kui korra, kuid tähtsust võivad omavad just spetsiifilise funktsiooniga domeenid. Sellele viitavad transposooni insertioonisaadid *pnp* geeni RNA-ga seondumise domeenis. Transposoonimutageneesi käigus tuvastasid kokku 103 inserteerumissaiti (andmed ei ole esitatud), mille tulemusena vähenes inhibitsioonitunnetus. Kuid välja arvatud kahel korral olid insertioonid toimunud samasse geeni ainult ühel korral. Seetõttu ei saa välistada, et olen selekteerinud Tn insertioone sisaldavaid mutante, mis suudavad kiiremini kasvada tänu *pheA* geeni kõrgemale ekspressioonitasemele või on lisaks Tn insertioonile inhibitsioonitunnetuse kaotanud kloonis toimunud lisamutatsioon hoopis mõnes teises geenis. Samas on ebatõenäoline, et kahel korral on transposoon inserteerunud samasse geeni ilma antud efekti põhjustamata, seda eriti veel *pnp* näitel.

Siiski on meil konstrueeritud üks deletsioonmutant geenist PP\_4173, kus deletsiooni tulemusena on hoopis suurenenud inhibitsioonitunnetus. Kordusplaatimisel selgus, et antud geeni deletsiooniga PheA<sup>+</sup>ΔPP\_4173 tüvi suudab moodustada väikseid kolooniaid alles 7. või 8. päeval. Ilma taustata plaadituna suudavad kolooniad moodustuda juba järgmiseks päevaks

ja erinevusi võrreldes algse tüvega ei paista. Järgnevalt tekitasime kahes *lacI-P<sub>tac</sub>pheBA* testsüsteemi sisaldavas tüves PP\_4173 deletsiooni ja viisime läbi akumulatsioonikatse, mille analüüsil tuvastasime testsüsteemi lokalisatsioonist tingitud mõju mutatsioonisagedusele. Kuigi phe-lacI\_19 tüves antud geeni deleteerimisel efekt puudus, nägime muutust phe-lacI\_30-s tüves. Statistiline erinevus esines kolmandal päeval tekkinud Phe<sup>+</sup> kolooniate arvus, kui võrrelda phe-lacI\_30 ja sellest loodud phe-lacI\_30<sup>+</sup>ΔPP\_4173 (vt. joonis 10). Saadud tulemused viitavad võimalusele, et teiste rakkude poolt põhjustav inhibitsioon mõjutab mutatsiooniprotsesse, tehes seda erinevalt sõltuvalt mutatsioonide märklaua asukohast bakteri kromosoomis. Kuna aga erinevused ilmneshid Phe<sup>+</sup> mutantide arvu osas, kus mutatsioonid peaksid olema tekkinud juba kasvavates rakkudes enne nende viimist selektiivsöötmele, peaks selles katses mutatsioonisagedusele ilmnenuu efekti toime mehhanisme uurima hoopis kasvavates rakkudes. See võiks aga olla juba üks uurimistöö edasisi eesmäärke.

# Kokkuvõte

Bakterid elavad pidevalt muutuvas keskkonnas, milles ellujäämiseks on neil kujunenud mitmed strateegiad. Ebasobivates oludes satuvad bakterid stressi, mille tulemusena hakkavad genoomis akumuleeruma mutatsioonid, millest mõned võivad suurendada bakterite kohastumust uue keskkonnaga. Sellist protsessi nimetatakse statsionaarse faasi mutageneesiks. Kuigi üpris palju on teada mutatsioonimehhanismidest kasvavates rakkudes, siis tunduvalt vähem on teada protsessidest, mis on seotud statsionaarse faasi mutatsioonide tekkega. Samuti on seni veel vähe uuritud mutatsioonide tekke sõltuvust kromosomaalsest lokalisatsioonist ning bakteritevaheliste signaalide mõju mutatsiooniprotsessidele.

Magistritöö teoreetilises osas andsin ülevaate bakterite kasvukiirusega seotud muutustest rakulistes protsessides ning põhjalikumalt käsitlust leidsid statsionaarses faasis toimuvad muutused. Kirjeldasin ka erinevaid mehhanisme, kuidas bakterid üksteisega suhtlevad. Lisaks andsin ülevaate bakterites aset leidvatest mutatsiooniprotsessidest ning sellest, mida on näidanud senised uuringud seoses kromosoomi eri piirkondade mõjust mutatsioonisagedusele.

Meie laboris uuritakse mutatsiooniprotsesside toimumist nii kasvavates kui ka statsionaarse faasi rakkudes bakteris *P. putida* (Kivisaar, 2010). Töö praktilises osas kasutasin kromosoomi erinevates piirkondades tekkinud mutatsioonispektrite iseloomustamiseks Triinu Juuriku konstrueeritud phe-lacI tüvesid, mis erinesid üksteisest testsüsteemi kromosomaalse lokalisatsiooni poolest. Saadud tulemused on avaldatud ka artiklis (Juurik jt, 2012). Lisaks uurisin statsionaarse faasi rakkude populatsioonis ilmnenuid bakterite omavahelisi interaktsioone, mis mõjutavad bakterikolooniate ilmumist selektiivsöötmetele. Käesoleva töö tulemused võib kokku võtta järgnevalt:

1. Kõigis uuritud kromosoomi lokalisatsioonides tuvastasime statistiliselt olulised erinevused mutatsioonispektrites. Tulemuste põhjal võib väita, et erinevad kromosoomipiirkonnad mõjutavad mutatsiooniprotsesse erinevalt.
2. Mutatsioonispektrid erinesid varajaste ja hiljem tekkinud Phe<sup>+</sup> mutantide seas. Näiteks esines mutatsioone, mis on iseloomulikud ainult 3. ja 4. päeval selektiivsöötmetele ilmunud Phe<sup>+</sup> mutantidele. Saadud tulemused viitavad erinevustele kasvavates ja statsionaarse faasi rakkudes toimuvates mutatsiooniprotsessides.
3. CTGG insertioonide ja deletsioonide teke on seotud replikatsioonikahvli liikumise orientatsiooniga sihmärkjärjestuse transkriptsiooni suuna suhtes, kus CTGG

insertsioonid tekivad eelistatult siis, kui CTGG matriits asub juhtival ahelal ja deletsioonid on eelistatud sel juhul, kui CTGG matriits asub mahajääval ahelal.

4. *IS1411* inserteerumise sagedus sõltub selle IS elemendi ja tema märklaua lokalisatsioonist kromosoomis, mis viitab sellele, et erinevused DNA topoloogias võivad mõjutada *IS1411* transponeerumist.
5. Inhibitsiooni mõju uurimiseks läbi viidud katsete tulemusel tuvastasime taustarakkude pidurdava mõju Phe<sup>+</sup> kolooniate moodustumisele, sealjuures suurim efekt avaldus liigisiselt. Kuna teiste liikide mõju kasvu pidurdumisele oli palju väiksem või puudus üldse, siis võib oletada, et inhibeerivad signaalid on võrdlemisi spetsiifilise iseloomuga.
6. Fenool-minimaalplaatidele ilmunud Phe<sup>+</sup> kolooniate mõju uurimisel uute kolooniate tekkele kinnitus juba varem plasmiidse testsüsteemi puhul kirjeldatud kolooniate moodustumist inhibeeriv efekt (Saumaa jt, 2002). Lisaks nägime juba tekkinud Phe<sup>+</sup> kolooniate eemaldamisel suure hulga uute kolooniate ilmumist juba järgmisel päeval, mis viitab sellele, et uute Phe<sup>+</sup> mutantide kolooniate teket selektiivsöötmele takistavad inhibiitorid on oma olemuselt ebastabiilsed. Võimalik, et inhibiitorid, mida produtseerivad juba kasvamahakanud Phe<sup>+</sup> kolooniad, pärivad hiljem tekkinud Phe<sup>+</sup> mutantide rakujagunemist. Samas ei saa me välistada võimalust, et inhibiitorid vähendavad ka mutatsioonisagedust.
7. Geeni PP\_4173 deleteerimine, mille tagajärjel suurenes bakterite inhibitsioonitunnetus, mõjutab mutatsioonisagedust sõltuvalt mutatsioonide märklaua asukohast kromosoomis.

# **Effect of chromosomal positions and communication between cells on mutational processes in *Pseudomonas putida***

## **Summary**

Tanel Ilmjärv

Bacteria live in a constantly changing environment and to survive under these conditions, they have evolved many strategies. When influenced by stressful factors, bacteria enter into stationary-phase. In stationary-phase, cells become smaller and more resistant to environmental damage like UV-radiation, toxins and antibiotics. Under those harsh conditions mutations start to accumulate and some of them may increase viability of cells. This mutational processes has been called as stationary-phase mutagenesis (Foster, 2007). There is a lot of information about mutational processes in growing cells, but less is known about mechanisms that operate in the stationary-phase. Moreover, there is still an open discussion about how mutational processes vary in different chromosomal locations and its involvement with interactions between bacteria (Sharp jt, 1989; Mira ja Ochman, 2002; Martina jt, 2012).

The literature review of my study gives an overview of changes in cellular processes at different growth rates of bacteria with the main focus on stationary-phase. Furthermore, I have described the main mechanisms of how bacteria communicate with each other. Lastly, I gave an introduction into bacterial mutational processes and an overview about the previous work done in the field of effect of chromosomal position on mutagenesis.

In our laboratory we have employed *Pseudomonas putida* as a model organism for studying mutational processes in bacteria (Kivisaar, 2010). In the experimental part of my study I examined the effect of the chromosomal position of the mutational target gene on the spectrum of mutations by using phe-lacI strains that were previously constructed by Triinu Juurik (Juurik, 2011) and that carry the test system in different chromosomal sites. The results of this study are published in the article (Juurik jt, 2012). I also investigated mechanisms of interconnections between bacterial cells in stationary-phase populations that influence the emergence of bacterial colonies onto selective plates.

The results of my study can be summarized as follows:

1. We have shown that there is a statistically significant difference in the spectrum of mutations in each analyzed chromosomal location. These results suggest that the

mechanisms of mutational processes vary depending on chromosomal positions of the mutational target sequence.

2. The spectrum of mutations varies among early- and late-arising Phe<sup>+</sup> mutants. For example, we have detected certain mutations only among early-arising mutants (mutants that appear on phenol-minimal plates on days 3 and 4), which implies to the difference between mutational processes in growing and stationary-phase cells.
3. The occurrence of CTGG insertions and deletions are influenced by the direction of movement of the replication fork regarding to the orientation of target sequence transcription. Insertions of CTGG occur predominantly in strains, where the CTGG template is located on the leading strand while CTGG deletions occurred mainly in the strains containing the CTGG template on the lagging strand.
4. The insertion frequency of *IS1411* element depends on the chromosomal location of this element and its target sequence, implying that differences in DNA topology affected transposition of this IS element.
5. We carried out several tests with the aim to investigate the ability of scavenger cells to inhibit the emergence of Phe<sup>+</sup> colonies onto phenol minimal plates. We found that the greatest inhibitional effects appear within the species, whereas other species have only minor effects or no effects at all. Therefore, we can assume that these inhibitional signals are quite specific in its nature.
6. When analyzing the ability of Phe<sup>+</sup> mutant colonies to repress the emergence of new colonies onto selective plates, we were able to see the same inhibitional effect as previously described in our laboratory by using plasmidial test system (Saumaa jt, 2002). Even more, we observed that after removal of all Phe<sup>+</sup> mutant colonies from selective plates the inhibition was relieved and more colonies rapidly appeared onto the plates. Thus, these inhibitors could be unstable. We suppose that inhibitors produced by the already existing colonies suppress the growth and colony formation of the later arising mutants. However, there is also a possibility the occurrence of mutations is reduced as well.
7. Deletion of the gene PP\_4173 which resulted in increased sensitivity of bacteria to inhibition, affected the frequency of mutations only at certain chromosomal location mutational target gene.

## Kasutatud kirjandus:

- Adams, J. (2004). "Microbial evolution in laboratory environments." *Research in Microbiology* 155(5): 311-318.
- Adams, M. H. (1959). "Bacteriophages." Interscience Publishers Inc. N. Y: 445-447.
- Adams, W. T. and T. R. Skopek (1987). "Statistical test for the comparison of samples from mutational spectra." *J Mol Biol* 194(3): 391-396.
- Aoki, S. K., E. J. Diner jt (2010). "A widespread family of polymorphic contact-dependent toxin delivery systems in bacteria." *Nature* 468(7322): 439-442.
- Battesti, A., N. Majdalani jt (2011). "The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*." *Annu Rev Microbiol* 65: 189-213.
- Bauchop, T. and S. R. Elsdon (1960). "The growth of micro-organisms in relation to their energy supply." *J Gen Microbiol* 23: 457-469.
- Bayley, S. A., C. J. Duggleby jt (1977). "Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2." *Mol Gen Genet* 154(2): 203-204.
- Bejerano-Sagie, M. and K. B. Xavier (2007). "The role of small RNAs in quorum sensing." *Curr Opin Microbiol* 10(2): 189-198.
- Bharatan, S. M., M. Reddy jt (2004). "Distinct signatures for mutator sensitivity of lacZ reversions and for the spectrum of lacI/lacO forward mutations on the chromosome of nondividing *Escherichia coli*." *Genetics* 166(2): 681-692.
- Boutte, C. C. and S. Crosson (2013). "Bacterial lifestyle shapes stringent response activation." *Trends Microbiol* 21(4): 174-180.
- Boyer, H. W. and D. Roulland-Dussoix (1969). "A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*." *J Mol Biol* 41(3): 459-472.
- Cairns, J. and P. L. Foster (1991). "Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli*." *Genetics* 128(4): 695-701.
- Cariello, N. F., W. W. Piegorsch jt (1994). "Computer program for the analysis of mutational spectra: application to p53 mutations." *Carcinogenesis* 15(10): 2281-2285.
- Carter, K. K., J. J. Valdes jt (2012). "Pathway engineering via quorum sensing and sRNA riboregulators—Interconnected networks and controllers." *Metabolic Engineering* 14(3): 281-288.
- Cupples, C. G. and J. H. Miller (1988). "Effects of amino acid substitutions at the active site in *Escherichia coli* beta-galactosidase." *Genetics* 120(3): 637-644.
- Decho, A. W., R. S. Norman jt (2010). "Quorum sensing in natural environments: emerging views from microbial mats." *Trends Microbiol* 18(2): 73-80.
- Diggle, S. P., R. E. Stacey jt (2006). "The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*." *Environ Microbiol* 8(6): 1095-1104.
- Diggle, S. P., K. Winzer jt (2003). "The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR." *Mol Microbiol* 50(1): 29-43.
- Dillon, S. C. and C. J. Dorman (2010). "Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression." *Nat Rev Microbiol* 8(3): 185-195.
- Duval-Valentin, G. and M. Chandler (2011). "Cotranslational control of DNA transposition: a window of opportunity." *Mol Cell* 44(6): 989-996.
- Federle, M. J. (2009). "Autoinducer-2-based chemical communication in bacteria: complexities of interspecies signaling." *Contrib Microbiol* 16: 18-32.

- Figurski, D. H. and D. R. Helinski (1979). "Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(4): 1648-1652.
- Fijałkowska, I. J., P. Jonczyk jt (1998). "Unequal fidelity of leading strand and lagging strand DNA replication on the *Escherichia coli* chromosome." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(17): 10020-10025.
- Finkel, S. E. (2006). "Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype." *Nat Rev Microbiol* 4(2): 113-120.
- Foster, P. L. (1999). "Mechanisms of stationary phase mutation: a decade of adaptive mutation." *Annu Rev Genet* 33: 57-88.
- Foster, P. L. (2007). "Stress-induced mutagenesis in bacteria." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42(5): 373-397.
- Foster, P. L. and J. M. Trimarchi (1994). "Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli* by simple base deletions in homopolymeric runs." *Science* 265(5170): 407-409.
- Foster, P. L. and J. M. Trimarchi (1995). "Adaptive reversion of an episomal frameshift mutation in *Escherichia coli* requires conjugal functions but not actual conjugation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(12): 5487-5490.
- Foster, P. L., J. M. Trimarchi jt (1996). "Two enzymes, both of which process recombination intermediates, have opposite effects on adaptive mutation in *Escherichia coli*." *Genetics* 142(1): 25-37.
- Friedberg, E. C., L. D. McDaniel jt (2004). "The role of endogenous and exogenous DNA damage and mutagenesis." *Current Opinion in Genetics & Development* 14(1): 5-10.
- Fuqua, C. and E. P. Greenberg (2002). "Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(9): 685-695.
- Galhardo, R. S., P. J. Hastings jt (2007). "Mutation as a stress response and the regulation of evolvability." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42(5): 399-435.
- Galloway, W. R., J. T. Hodgkinson jt (2011). "Quorum sensing in Gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways." *Chem Rev* 111(1): 28-67.
- Gantner, S., M. Schmid jt (2006). "In situ quantitation of the spatial scale of calling distances and population density-independent N-acylhomoserine lactone-mediated communication by rhizobacteria colonized on plant roots." *FEMS Microbiol Ecol* 56(2): 188-194.
- Gawel, D., P. Jonczyk jt (2002). "Asymmetry of frameshift mutagenesis during leading and lagging-strand replication in *Escherichia coli*." *Mutat Res* 501(1-2): 129-136.
- Gawel, D., M. Maliszewska-Tkaczyk jt (2002). "Lack of strand bias in UV-induced mutagenesis in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 184(16): 4449-4454.
- Gentry, D. R. and M. Cashel (1996). "Mutational analysis of the *Escherichia coli* *spoT* gene identifies distinct but overlapping regions involved in ppGpp synthesis and degradation." *Molecular Microbiology* 19(6): 1373-1384.
- Gottesman, S. (2005). "Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria." *Trends Genet* 21(7): 399-404.
- Gray, J. V., G. A. Petsko jt (2004). "'Sleeping beauty': quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*." *Microbiol Mol Biol Rev* 68(2): 187-206.
- Gruber, T. M. and C. A. Gross (2003). "Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space." *Annu Rev Microbiol* 57: 441-466.
- Hanahan, D. and M. Meselson (1983). "Plasmid screening at high colony density." *Methods Enzymol* 100: 333-342.
- Hayes, C. S., S. K. Aoki jt (2010). "Bacterial contact-dependent delivery systems." *Annu Rev Genet* 44: 71-90.
- Heeb, S., M. P. Fletcher jt (2011). "Quinolones: from antibiotics to autoinducers." *FEMS Microbiol Rev* 35(2): 247-274.



- Hengge, R. (2008). The Two-Component Network and the General Stress Sigma Factor RpoS ( $\sigma^S$ ) in *Escherichia coli*. *Bacterial Signal Transduction: Networks and Drug Targets*. R. Utsumi, Springer New York. 631: 40-53.
- Herrero, M., V. de Lorenzo jt (1990). "Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria." *J Bacteriol* 172(11): 6557-6567.
- Hudson, R. E., U. Bergthorsson jt (2002). "Effect of Chromosome Location on Bacterial Mutation Rates." *Molecular Biology and Evolution* 19(1): 85-92.
- Hudson, R. E., U. Bergthorsson jt (2002). "Effect of chromosome location on bacterial mutation rates." *Mol Biol Evol* 19(1): 85-92.
- Huisman, G. W., D. A. Siegele jt (1996). "Morphological and Physiological Changes During Stationary Phase." American Society for Microbiology Press, Washington, DC.
- Hwang, G., Y. M. Ban jt (2008). "Adhesion of *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 to a naphthalene-contaminated soil." *Colloids Surf B Biointerfaces* 62(1): 91-96.
- Isberg, R. R. and M. Syvanen (1982). "DNA gyrase is a host factor required for transposition of Tn5." *Cell* 30(1): 9-18.
- Jimenez, P. N., G. Koch jt (2012). "The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*." *Microbiol Mol Biol Rev* 76(1): 46-65.
- Juurik, T. (2011). "Mutatsiooniprotsessid bakteri *Pseudomonas putida* kromosoomis."
- Juurik, T., H. Ilves jt (2012). "Mutation frequency and spectrum of mutations vary at different chromosomal positions of *Pseudomonas putida*." *PLoS One* 7(10): e48511.
- Kallastu, A., R. Horak jt (1998). "Identification and characterization of IS1411, a new insertion sequence which causes transcriptional activation of the phenol degradation genes in *Pseudomonas putida*." *J Bacteriol* 180(20): 5306-5312.
- Kang, S., A. Jaworski jt (1995). "Expansion and deletion of CTG repeats from human disease genes are determined by the direction of replication in *E. coli*." *Nat Genet* 10(2): 213-218.
- Kasak, L., R. Horak jt (1997). "Promoter-creating mutations in *Pseudomonas putida*: a model system for the study of mutation in starving bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(7): 3134-3139.
- Kivisaar, M. (2010). "Mechanisms of stationary-phase mutagenesis in bacteria: mutational processes in pseudomonads." *FEMS Microbiology Letters* 312(1): 1-14.
- Lacour, S. and P. Landini (2004). "SigmaS-dependent gene expression at the onset of stationary phase in *Escherichia coli*: function of sigmaS-dependent genes and identification of their promoter sequences." *J Bacteriol* 186(21): 7186-7195.
- Landgraf, J. R., J. Wu jt (1996). "Effects of nutrition and growth rate on Lrp levels in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 178(23): 6930-6936.
- Lombardo, M. J., I. Aponyi jt (2004). "General stress response regulator RpoS in adaptive mutation and amplification in *Escherichia coli*." *Genetics* 166(2): 669-680.
- MacLean, R. C., C. Torres-Barcelo jt (2013). "Evaluating evolutionary models of stress-induced mutagenesis in bacteria." *Nat Rev Genet* 14(3): 221-227.
- Magnusson, L. U., A. Farewell jt (2005). "ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*." *Trends Microbiol* 13(5): 236-242.
- Maliszewska-Tkaczyk, M., P. Jonczyk jt (2000). "SOS mutator activity: unequal mutagenesis on leading and lagging strands." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(23): 12678-12683.
- Martina, M. A., E. M. Correa jt (2012). "*Escherichia coli* frameshift mutation rate depends on the chromosomal context but not on the GATC content near the mutation site." *PLoS One* 7(3): 16.
- Martinez-Garcia, E., B. Calles jt (2011). "pBAM1: an all-synthetic genetic tool for analysis and construction of complex bacterial phenotypes." *BMC Microbiol* 11: 38.

- Martinez-Garcia, E. and V. de Lorenzo (2011). "Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440." *Environ Microbiol* 13(10): 2702-2716.
- Mashburn-Warren, L., J. Howe jt (2008). "Interaction of quorum signals with outer membrane lipids: insights into prokaryotic membrane vesicle formation." *Mol Microbiol* 69(2): 491-502.
- McKenzie, G. J., P. L. Lee jt (2001). "SOS mutator DNA polymerase IV functions in adaptive mutation and not adaptive amplification." *Mol Cell* 7(3): 571-579.
- Merimaa, M., E. Heinaru jt (2006). "Grouping of phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase genes among phenol- and p-cresol-degrading *Pseudomonas* species and biotypes." *Arch Microbiol* 186(4): 287-296.
- Miller, J. H. (1972). "Experiments in Molecular Genetics." Cold Spring Harbour Press N.Y.
- Miller, J. H. (1992). "A short course in bacterial genetics." Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Mira, A. and H. Ochman (2002). "Gene location and bacterial sequence divergence." *Mol Biol Evol* 19(8): 1350-1358.
- Navarro Llorens, J. M., A. Tormo jt (2010). "Stationary phase in gram-negative bacteria." *FEMS Microbiol Rev* 34(4): 476-495.
- Nystrom, T. (2004). "Stationary-phase physiology." *Annu Rev Microbiol* 58: 161-181.
- Piegorsch, W. W. and A. J. Bailer (1994). "Statistical approaches for analyzing mutational spectra: some recommendations for categorical data." *Genetics* 136(1): 403-416.
- Pin, C. and J. Baranyi (2008). "Single-cell and population lag times as a function of cell age." *Appl Environ Microbiol* 74(8): 2534-2536.
- Pitcher, R. S., N. C. Brissett jt (2007). "Nonhomologous end-joining in bacteria: a microbial perspective." *Annu Rev Microbiol* 61: 259-282.
- Ponder, R. G., N. C. Fonville jt (2005). "A switch from high-fidelity to error-prone DNA double-strand break repair underlies stress-induced mutation." *Mol Cell* 19(6): 791-804.
- Ren, D., L. A. Bedzyk jt (2004). "Stationary-Phase Quorum-Sensing Signals Affect Autoinducer-2 and Gene Expression in *Escherichia coli*." *Appl Environ Microbiol* 70(4): 2038-2043.
- Repoila, F. and S. Gottesman (2001). "Signal transduction cascade for regulation of RpoS: temperature regulation of DsrA." *J Bacteriol* 183(13): 4012-4023.
- Rho, T. C., E. A. Bae jt (1999). "Anti-*Helicobacter pylori* activity of quinolone alkaloids from *Evodia fructus*." *Biol Pharm Bull* 22(10): 1141-1143.
- Rosenberg, S. M. (2001). "Evolving responsively: adaptive mutation." *Nat Rev Genet* 2(7): 504-515.
- Rosenberg, S. M. and P. J. Hastings (2004). "Adaptive point mutation and adaptive amplification pathways in the *Escherichia coli* Lac system: stress responses producing genetic change." *J Bacteriol* 186(15): 4838-4843.
- Rosenberg, S. M., S. Longerich jt (1994). "Adaptive mutation by deletions in small mononucleotide repeats." *Science* 265(5170): 405-407.
- Ross, C., C. Pybus jt (2006). "Novel role of *mfd*: effects on stationary-phase mutagenesis in *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* 188(21): 7512-7520.
- Roth, J. R. and D. I. Andersson (2004). "Amplification-mutagenesis--how growth under selection contributes to the origin of genetic diversity and explains the phenomenon of adaptive mutation." *Res Microbiol* 155(5): 342-351.
- Ruhe, Z. C., D. A. Low jt (2013). "Bacterial contact-dependent growth inhibition." *Trends Microbiol*.
- Rutherford, S. T. and B. L. Bassler (2012). "Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control." *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(11).

- Saumaa, S., K. Tarassova jt (2006). "Involvement of DNA mismatch repair in stationary-phase mutagenesis during prolonged starvation of *Pseudomonas putida*." *DNA Repair* 5(4): 505-514.
- Saumaa, S., A. Tover jt (2002). "Different spectra of stationary-phase mutations in early-arising versus late-arising mutants of *Pseudomonas putida*: involvement of the DNA repair enzyme MutY and the stationary-phase sigma factor RpoS." *J Bacteriol* 184(24): 6957-6965.
- Schaaper, R. M., B. N. Danforth jt (1986). "Mechanisms of spontaneous mutagenesis: an analysis of the spectrum of spontaneous mutation in the *Escherichia coli* lacI gene." *J Mol Biol* 189(2): 273-284.
- Sharma, R. C. and R. T. Schimke (1996). "Preparation of electrocompetent *E. coli* using salt-free growth medium." *Biotechniques* 20(1): 42-44.
- Sharp, P. M., D. C. Shields jt (1989). "Chromosomal location and evolutionary rate variation in enterobacterial genes." *Science* 246(4931): 808-810.
- Slechta, E. S. and M. A. Mulvey (2006). "Contact-dependent inhibition: bacterial brakes and secret handshakes." *Trends Microbiol* 14(2): 58-60.
- Soper, T., P. Mandin jt (2010). "Positive regulation by small RNAs and the role of Hfq." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(21): 9602-9607.
- Stover, C. K., X. Q. Pham jt (2000). "Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen." *Nature* 406(6799): 959-964.
- Streisinger, G. and J. Owen (1985). "Mechanisms of spontaneous and induced frameshift mutation in bacteriophage T4." *Genetics* 109(4): 633-659.
- Sung, H. M. and R. E. Yasbin (2002). "Adaptive, or stationary-phase, mutagenesis, a component of bacterial differentiation in *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* 184(20): 5641-5653.
- Sung, H. M., G. Yeaman jt (2003). "Roles of YqjH and YqjW, homologs of the *Escherichia coli* UmuC/DinB or Y superfamily of DNA polymerases, in stationary-phase mutagenesis and UV-induced mutagenesis of *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* 185(7): 2153-2160.
- Tani, T. H., A. Khodursky jt (2002). "Adaptation to famine: a family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(21): 13471-13476.
- Tarassova, K., R. Tegova jt (2009). "Elevated mutation frequency in surviving populations of carbon-starved rpoS-deficient *Pseudomonas putida* is caused by reduced expression of superoxide dismutase and catalase." *J Bacteriol* 191(11): 3604-3614.
- Tark, M., A. Tover jt (2008). "Dual role of NER in mutagenesis in *Pseudomonas putida*." *DNA Repair* 7(1): 20-30.
- Tegova, R., A. Tover jt (2004). "Involvement of Error-Prone DNA Polymerase IV in Stationary-Phase Mutagenesis in *Pseudomonas putida*." *J Bacteriol* 186(9): 2735-2744.
- Tenaillon, O., E. Denamur jt (2004). "Evolutionary significance of stress-induced mutagenesis in bacteria." *Trends Microbiol* 12(6): 264-270.
- Travers, A. and G. Muskhelishvili (2005). "DNA supercoiling - a global transcriptional regulator for enterobacterial growth?" *Nat Rev Microbiol* 3(2): 157-169.
- Tsui, H. C., G. Feng jt (1997). "Negative regulation of mutS and mutH repair gene expression by the Hfq and RpoS global regulators of *Escherichia coli* K-12." *J Bacteriol* 179(23): 7476-7487.
- Updegrove, T. B. and R. M. Wartell (2011). "The influence of *Escherichia coli* Hfq mutations on RNA binding and sRNA-mRNA duplex formation in rpoS riboregulation." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1809(10): 532-540.
- Vanlint, D., N. Rutten jt (2013). "Exposure to high hydrostatic pressure rapidly selects for increased RpoS activity and general stress-resistance in *Escherichia coli* O157:H7." *International Journal of Food Microbiology* 163(1): 28-33.
- Williams, P. (2006). "Quorum sensing." *International Journal of Medical Microbiology* 296(2-3): 57-59.

- Wong, S. M. and J. J. Mekalanos (2000). "Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(18): 10191-10196.
- Wright, B. E. (2004). "Stress-directed adaptive mutations and evolution." *Mol Microbiol* 52(3): 643-650.
- Xavier, K. B. and B. L. Bassler (2003). "LuxS quorum sensing: more than just a numbers game." *Curr Opin Microbiol* 6(2): 191-197.

## **Kasutatud veebiaadressid**

[www.advancedhealing.com/quorum-sensing-and-biofilm](http://www.advancedhealing.com/quorum-sensing-and-biofilm)

[www.ibiblio.org/dnam/des\\_hypg.htm](http://www.ibiblio.org/dnam/des_hypg.htm)

[www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)

# Lisamaterjalid

**Lisa 1. Phe<sup>+</sup> mutantides lacI geenis ja operaatoralas tekkinud mutatsioonide spekter erinevates phe-lacI tüvedes** (sulgudes on toodud antud mutatsiooni esinemissagedus kõigist mutatsioonidest)

Positsioon	Mutatsioon	Esinemissagedus erinevates pheA-lacI tüvedes					
		105	110	115	117	18	31
-354	Del T	1 (0.709)	0	0	0	0	0
-353	Del 2 nt (TC)	1 (0.709)	0	0	1 (1.234)	0	0
-352	C → T	14 (9.927)	9 (8.381)	6 (6.746)	16 (19.74)	8 (1.951)	3 (2.622)
-352	C → G	2 (1.418)	0	0	0	0	0
-351	G → T	1 (0.709)	0	0	0	0	1 (0.874)
-351	G → A	13 (9.218)	26 (24.21)	27 (30.36)	16 (19.74)	38 (9.266)	38 (33.21)
-349	T → G	0	0	0	0	1 (0.244)	0
-349	T → C	0	0	2 (2.249)	0	0	0
-348	C → A	0	0	1 (1.124)	0	0	0
-347	A → G	0	0	1 (1.124)	0	0	0
-347	Ins A	0	1 (0.931)	0	3 (3.702)	0	0
-346	C → T	0	1 (0.931)	0	1 (1.234)	0	0
-345	Ins C	0	0	0	1 (1.234)	0	0
-3	Del 288 nt	1 (0.709)	0	0	0	0	0
13	A → G	0	0	0	0	1 (0.244)	0
22	Ins 22 nt	1 (0.709)	0	0	0	0	0
24	T → C	1 (0.709)	0	0	0	0	0
26	T → C	0	0	0	0	1 (0.244)	0
29	C → T	0	0	0	1 (1.234)	0	0
37	Del G	0	1 (0.931)	0	0	0	0
44	T → C	0	0	0	0	0	4 (3.495)
49	Del T	0	0	0	0	2 (0.488)	0
51	Ins A	0	0	0	0	2 (0.488)	0

<b>52</b>	Ins T	0	0	0	0	1 (0.244)	0
<b>53</b>	A → C	0	1 (0.931)	0	0	0	0
<b>53</b>	A → G	0	1 (0.931)	0	1 (1.234)	0	0
<b>54</b>	G → T	0	0	1 (1.124)	0	0	0
<b>55</b>	A → G	0	3 (2.794)	0	4 (4.935)	4 (0.975)	0
<b>62</b>	C → T	3 (2.127)	0	0	2 (2.468)	1 (0.244)	0
<b>75</b>	C → G	1 (0.709)	0	0	0	0	0
<b>89</b>	T → C	0	1 (0.931)	0	0	0	0
<b>96</b>	Ins 2 nt (CG)	0	0	0	2 (2.468)	0	0
<b>100</b>	Ins 10 nt	0	0	0	1 (1.234)	0	0
<b>111</b>	Ins 10 nt	1 (0.709)	0	0	0	3 (0.732)	0
<b>131</b>	G → C	1 (0.709)	0	0	0	0	0
<b>140</b>	A → G	0	1 (0.931)	0	0	0	1 (0.874)
<b>141</b>	C → G	1 (0.709)	0	0	0	0	1 (0.874)
<b>146</b>	C → T	1 (0.709)	0	0	0	1 (0.244)	0
<b>149</b>	Ins T	0	0	0	0	1 (0.244)	0
<b>158</b>	C → A	0	1 (0.931)	0	0	0	0
<b>167</b>	T → A	0	0	0	0	4 (0.975)	0
<b>170</b>	C → T	0	0	1 (1.124)	1 (1.234)	0	0
<b>178</b>	C → T	4 (2.836)	0	0	5 (6.169)	0	0
<b>221</b>	Del A	0	0	0	19 (23.44)	0	0
<b>232</b>	G → T	0	0	0	1 (1.234)	0	0
<b>253</b>	Del T	0	0	0	0	1 (0.244)	0
<b>253</b>	Del 14 nt	0	0	0	1 (1.234)	0	0
<b>291</b>	G → T	2 (1.418)	0	0	0	0	0
<b>299</b>	Del 149 nt	0	1 (0.931)	0	0	0	0
<b>300</b>	Del 10 nt	0	0	0	0	7 (1.707)	0
<b>310</b>	Del G	0	0	1 (1.124)	0	0	0
<b>313</b>	G → C	0	1 (0.931)	0	0	0	0
<b>313</b>	G → T	1 (0.709)	0	0	0	0	0

<b>391</b>	C → T	0	1 (0.931)	0	0	0	0
<b>394</b>	Del 66 nt	1 (0.709)	0	0	0	0	0
<b>399</b>	Ins C	0	0	0	1 (1.234)	0	0
<b>403</b>	Ins T	0	0	0	1 (1.234)	0	0
<b>405</b>	Ins T	1 (0.709)	0	0	0	0	0
<b>409</b>	Ins G	1 (0.709)	0	0	0	0	0
<b>457</b>	C → T	0	1 (0.931)	0	0	0	0
<b>458</b>	Ins C	0	0	1 (1.124)	0	0	0
<b>460</b>	Ins G	0	0	1 (1.124)	0	0	0
<b>475</b>	Ins T	0	0	0	1 (1.234)	0	0
<b>476</b>	Ins T	1 (0.709)	0	0	2 (2.468)	0	0
<b>479</b>	Ins T	1 (0.709)	0	0	0	0	0
<b>490</b>	Ins A	0	0	0	0	1 (0.244)	0
<b>504</b>	Ins G	0	0	0	0	0	3 (2.622)
<b>541</b>	C → T	0	0	0	0	2 (0.488)	0
<b>552</b>	Del G	1 (0.709)	0	0	0	0	0
<b>592</b>	Ins CTGG	3 (2.127)	3 (2.794)	58 (65.21)	1 (1.234)	6 (1.463)	65 (56.8)
<b>592</b>	Del CTGG	18 (12.76)	44 (40.98)	3 (3.373)	18 (22.21)	37 (9.022)	8 (6.991)
<b>603</b>	G → A	0	0	0	0	0	1 (0.874)
<b>653</b>	G → T	1 (0.709)	0	0	1 (1.234)	0	0
<b>661</b>	Ins C	1 (0.709)	0	0	1 (1.234)	0	0
<b>669</b>	Del G	0	0	0	1 (1.234)	1 (0.244)	0
<b>682</b>	C → T	0	0	0	0	1 (0.244)	0
<b>705</b>	Ins T	0	0	0	1 (1.234)	0	0
<b>751</b>	C → A	0	0	0	0	0	1 (0.874)
<b>754</b>	G → T	10 (7.091)	0	0	0	0	0
<b>779</b>	Ins 2 nt (CA)	0	0	1 (1.124)	0	0	0
<b>780</b>	C → A	1 (0.709)	0	0	0	0	0
<b>858</b>	A → C	0	0	0	1 (1.234)	0	0
<b>916</b>	C → T	0	2 (1.863)	0	0	0	0

<b>983</b>	C → T	0	0	0	1 (1.234)	0	0
<b>IS1411</b>		17 (12.05)	12 (11.18)	8 (8.995)	16 (19.74)	4 (0.975)	2 (1.748)
<b>teadmata</b>		3 (2.127)	1 (0.931)	3 (3.373)	5 (6.169)	2 (0.488)	2 (1.748)
<b>Üldine mutatasioonisagedus</b>		78	104.3	129.3	156.7	31.juuli	113.6
<b>Kokku analüüsitud</b>		110	112	115	127	130	130

**Lisa 2. Sekveneeritud *lacI-P<sub>lac</sub>pheBA* testsüsteemi abil tuvastatud Phe<sup>+</sup> mutatsioonide paariviisilised võrdlused ja saadud *P*-väärtused** (esitatud on tulemused, mille *P* < 0.05)

	phe-lacI tüved	<i>P</i> -väärtus
<b>Operatorala mutatsioonid</b>		
<b>-352 C→T</b>	105 vs. 115	0.048
	105 vs. 31	0.002
	110 vs. 31	0.041
	115 vs. 117	0.046
	117 vs. 31	0.002
<b>-351 G→A</b>	105 vs. 110	0.026
	105 vs. 115	0.022
	105 vs. 18	0.001
	105 vs. 31	0.001
	110 vs. 117	0.031
	115 vs. 117	0.027
	117 vs. 18	0.001
	117 vs. 31	0.001
<b>Ühe ap mutatsioonid <i>lacI</i> geenis</b>		
<b>221 del A</b>	117 vs. 105	<0.001
	117 vs. 110	<0.001
	117 vs. 115	<0.001
	117 vs. 18	<0.001
	117 vs. 31	<0.001
<b>754 G→T</b>	105 vs. 110	0.001
	105 vs. 115	0.001
	105 vs. 117	0.001
	105 vs. 18	<0.001
	105 vs. 31	<0.001
<b>Suured deletsioonid</b>		
<b>300 del 10 nt</b>	18 vs. 105	0.014
	18 vs. 110	0.013
	18 vs. 115	0.012
	18 vs. 117	0.008
	18 vs. 31	0.007
<b>592 ins CTGG</b>		
	105 vs. 115	<0.001
	105 vs. 31	<0.001
	110 vs. 115	<0.001
	110 vs. 31	<0.001
	115 vs. 117	<0.001



115 vs. 18	<0.001
117 vs. 31	<0.001
18 vs. 31	<0.001
<b>592 del CTGG</b>	
105 vs. 110	<0.001
105 vs. 115	<0.001
105 vs. 18	0.026
105 vs. 31	0.011
110 vs. 115	<0.001
110 vs. 117	<0.001
110 vs. 31	0.001
115 vs. 117	0.001
115 vs. 18	<0.001
117 vs. 18	0.005
117 vs. 31	0.033
18 vs. 31	<0.001
<b>IS1411 insertioonid</b>	
105 vs. 115	0.043
105 vs. 18	0.001
105 vs. 31	<0.001
110 vs. 18	0.017
110 vs. 31	0.002
115 vs. 31	0.032
117 vs. 18	0.004
117 vs. 31	0.001

**Lisa 3. Erinevatel päevadel selektiivsöötmele ilmunud Phe<sup>+</sup> kolooniate mutatsioonispektrid** (sulgudes on toodud antud mutatsiooni esinemissagedus kõigist mutatsioonidest).

Kolmandal ja neljandal päeval selektiivsöötmele ilmunud Phe<sup>+</sup> kolooniates tekkinud mutatsioonid

		phe-lacI tüved					
Positsioon	Mutatsioon	105	110	115	117	18	31
<b>-352</b>	C → T	0	0	0	0	3 (0.406)	0
<b>26</b>	T → C	0	0	0	0	1 (0.135)	0
<b>37</b>	Del G	0	1 (0.422)	0	0	0	0
<b>49</b>	Del T	0	0	0	0	2 (0.27)	0
<b>51</b>	Ins A	0	0	0	0	1 (0.135)	0
<b>52</b>	Ins T	0	0	0	0	1 (0.135)	0
<b>53</b>	A → C	0	1 (0.422)	0	0	0	0
<b>53</b>	A → G	0	1 (0.422)	0	0	0	0
<b>54</b>	G → T	0	0	1 (1.45)	0	0	0
<b>55</b>	A → G	0	1 (0.422)	0	0	2 (0.27)	0
<b>62</b>	C → T	1 (0.142)	0	0	2 (1.588)	1 (0.244)	0
<b>89</b>	T → C	0	1 (0.422)	0	0	0	0

<b>96</b>	Ins 2 nt (CG)	0	0	0	2 (1.588)	0	0
<b>149</b>	Ins T	0	0	0	0	1 (0.135)	0
<b>167</b>	T → A	0	0	0	0	4 (0.541)	0
<b>170</b>	C → T	0	0	1 (1.45)	1 (0.794)	0	0
<b>221</b>	Del A	0	0	0	19 (15.09)	0	0
<b>232</b>	G → T	0	0	0	1 (0.794)	0	0
<b>253</b>	Del T	0	0	0	0	1 (0.135)	0
<b>391</b>	C → T	0	1 (0.422)	0	0	0	0
<b>403</b>	Ins T	0	0	0	1 (0.794)	0	0
<b>405</b>	Ins T	1 (0.142)	0	0	0	0	0
<b>409</b>	Ins G	1 (0.142)	0	0	0	0	0
<b>457</b>	C → T	0	1 (0.422)	0	0	0	0
<b>475</b>	Ins T	0	0	0	1 (0.794)	0	0
<b>476</b>	Ins T	1 (0.142)	0	0	2 (1.588)	0	0
<b>490</b>	Ins A	0	0	0	0	1 (0.135)	0
<b>504</b>	Ins G	0	0	0	0	0	3 (2.47)
<b>552</b>	Del G	1 (0.142)	0	0	0	0	0
<b>592</b>	Ins CTGG	1 (0.142)	0	34 (49.3)	1 (0.794)	3 (0.406)	42 (34.57)
<b>592</b>	Del CTGG	12 (1.708)	38 (16.04)	2 (2.9)	12 (9.528)	30 (4.056)	4 (3.293)
<b>603</b>	G → A	0	0	0	0	0	1 (0.823)
<b>669</b>	Del G	0	0	0	1 (0.794)	0	0
<b>705</b>	Ins T	0	0	0	1 (0.794)	0	0
<b>754</b>	G → T	8 (1.138)	0	0	0	0	0
<b>858</b>	A → C	0	0	0	1 (0.794)	0	0
<b>916</b>	C → T	0	2 (0.844)	0	0	0	0
<b>IS1411</b>		0	3 (1.266)	5 (7.25)	3 (2.382)	0	0
<b>Teadmata</b>		0	0	1 (1.45)	2 (1.588)	0	0
<b>Üldine mutatsioonisagedus</b>		3.7	21.1	63.8	39.7	6.76	41.16
<b>Kokku analüüsitud</b>		26	50	44	50	50	50

Viiendal päeval selektiivsöötmele ilmunud Phe<sup>+</sup> kolooniates tekkinud mutatsioonid

		phe-lac I tüved					
Positsioon	Mutatsioon	105	110	115	117	18	31
<b>-354</b>	Del T	1 (0.106)	0	0	0	0	0
<b>-353</b>	Del 2 nt (TC)	1 (0.106)	0	0	0	0	0
<b>-352</b>	C → T	0	9 (5.026)	4 (2.963)	11 (17.57)	5 (0.988)	2 (0.919)
<b>-352</b>	C → G	1 (0.106)	0	0	0	0	0
<b>-351</b>	G → T	1 (0.106)	0	0	0	0	1 (0.46)

<b>-351</b>	G → A	1 (0.106)	0	0	1 (1.597)	0	0
<b>-347</b>	A → G	0	0	1 (0.741)	0	0	0
<b>-347</b>	Ins A	0	0	0	3 (4.792)	0	0
<b>-345</b>	Ins C	0	0	0	1 (1.597)	0	0
<b>-3</b>	Del 288 nt	1 (0.106)	0	0	0	0	0
<b>13</b>	A → G	0	0	0	0	1 (0.198)	0
<b>44</b>	T → C	0	0	0	0	0	4 (1.839)
<b>51</b>	Ins A	0	0	0	0	1 (0.198)	0
<b>53</b>	A → G	0	0	0	1 (1.597)	0	0
<b>55</b>	A → G	0	2 (1.117)	0	1 (1.597)	1 (0.198)	0
<b>62</b>	C → T	2 (0.213)	0	0	0	1 (0.198)	0
<b>100</b>	Ins 10 nt	0	0	0	1 (1.597)	0	0
<b>111</b>	Ins 10 nt	1 (0.106)	0	0	0	3 (0.593)	0
<b>131</b>	G → C	1 (0.106)	0	0	0	0	0
<b>140</b>	A → G	0	1 (0.558)	0	0	0	
<b>158</b>	C → A	0	1 (0.558)	0	0	0	0
<b>178</b>	C → T	4 (0.425)	0	0	0	0	0
<b>299</b>	Del 149 nt	0	1 (0.558)	0	0	0	0
<b>300</b>	Del 10 nt	0	0	0	0	7 (1.384)	0
<b>310</b>	Del G	0	0	1 (0.741)	0	0	0
<b>394</b>	Del 66 nt	1 (0.106)	0	0	0	0	0
<b>399</b>	Ins C	0	0	0	1 (1.597)	0	0
<b>479</b>	Ins T	1 (0.106)	0	0	0	0	0
<b>592</b>	Ins CTGG	0	1 (0.558)	15 (11.11)	0	2 (0.395)	15 (6.895)
<b>592</b>	Del CTGG	4 (0.425)	4 (2.234)	0	3 (4.792)	4 (0.791)	4 (1.839)
<b>669</b>	Del G	0	0	0	1 (1.234)	1 (0.198)	0
<b>751</b>	C → A	0	0	0	0	0	1 (0.46)
<b>754</b>	G → T	2 (0.213)	0	0	0	0	0
<b>779</b>	Ins 2 nt (CA)	0	0	1 (0.741)	0	0	0
<b>780</b>	C → A	1 (0.106)	0	0	0	0	0
<b>983</b>	C → T	0	0	0	1 (1.597)	0	0
<b>IS1411</b>		8 (0.85)	5 (2.792)	1 (0.741)	2 (3.195)	4 (0.791)	2 (0.919)
<b>Teadmata</b>		1 (0.106)	1 (0.558)	1 (0.741)	1 (1.597)	0	1 (0.46)
<b>Üldine mutatsioonisagedus</b>		3.4	13.96	17.78	43.13	5.93	13.79
<b>Kokku analüüsitud</b>		32	25	24	27	30	30

Kuuendal ja seitsmendal päeval selektiivsöötmele ilmunud Phe<sup>+</sup> kolooniates tekkinud mutatsioonid

Positsioon	Mutatsioon	phe-lacI tüved					
		105	110	115	117	18	31
-353	Del 2 nt (TC)	0	0	0	1 (1.477)	0	0
-352	C → T	14 (19.09)	0	2 (2.034)	5 (7.386)	0	1 (1.174)
-352	C → G	1 (1.363)	0	0	0	0	0
-351	G → A	12 (16.36)	26 (48.69)	27 (27.45)	15 (22.16)	38 (14.48)	38 (44.6)
-349	T → G	0	0	0	0	1 (0.381)	0
-349	T → C	0	0	2 (2.034)	0	0	0
-348	C → A	0	0	1 (1.017)	0	0	0
-347	Ins A	0	1 (1.873)	0	0	0	0
-346	C → T	0	1 (1.873)	0	1 (1.477)	0	0
22	Ins 22 nt	1 (1.363)	0	0	0	0	0
24	T → C	1 (1.363)	0	0	0	0	0
29	C → T	0	0	0	1 (1.477)	0	0
55	A → G	0	0	0	3 (4.432)	1 (0.381)	0
75	C → G	1 (1.363)	0	0	0	0	0
140	A → G	0	0	0	0	0	1 (1.174)
141	C → G	1 (1.363)	0	0	0	0	1 (1.174))
146	C → T	1 (1.363)	0	0	0	1 (0.381)	0
178	C → T	0	0	0	5 (7.386)	0	0
253	Del 14 nt	0	0	0	1 (1.477)	0	0
291	G → T	2 (2.727)	0	0	0	0	0
313	G → C	0	1 (1.873)	0	0	0	0
313	G → T	1 (1.363)	0	0	0	0	0
458	Ins C	0	0	1 (1.017)	0	0	0
460	Ins G	0	0	1 (1.017)	0	0	0
541	C → T	0	0	0	0	2 (0.762)	0
592	Ins CTGG	2 (2.727)	2 (3.745)	9 (9.151)	0	1 (0.381)	8 (9.39)
592	Del CTGG	2 (2.727)	2 (3.745)	1 (1.017)	3 (4.432)	3 (1.143)	0
653	G → T	1 (1.363)	0	0	1 (1.477)	0	0
661	Ins C	1 (1.363)	0	0	1 (1.477)	0	0
682	C → T	0	0	0	0	1 (0.381)	0
IS1411		9 (12.27)	4 (7.491)	2 (2.034)	11 (16.25)	4 (0.975)	0
Teadmata		2 (2.727)	0	1 (1.017)	2 (2.954)	2 (0.762)	1 (1.174)
Üldine mutatsioonisagedus		70.9	69.29	47.79	73.86	19.05	58.69
Kokku analüüsitud		52	37	47	50	50	50

**Lisa 4. Erinevatel päevadel selektiivsöötmele ilmunud Phe<sup>+</sup> kolooniates tekkinud mutatsioonide spektrite võrdlus** (tabelis on toodud *P*-väärtused).

Võrreldavad	105	110	115	117	18	31
Päevad 3-4 võrrelduna päevaga 5	0.008	0.0099	0.28	0.0002	<i>P</i> < 0.0001	0.0039
Päevad 3-4 võrrelduna päevadega 6-7	0.0003	0.028	0.331	<i>P</i> < 0.0001	0.0622	0.0836
5. päev võrrelduna päevadega 6-7	0.0084	0.714	0.307	0.0458	0.0991	0.0836

### Lisa 5. Mutatsioonispektrite võrdlus päevade lõikes

Päev	Tüvi	Tüvi				
		105	110	115	117	18
<b>Kokku (3.-7. päev)</b>	110	$P < 0.0001$				
	115	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$			
	117	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$		
	18	$P < 0.0001$	0.0011	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$	
	31	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$	0.0087	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$
<b>3.4.</b>	110	$P < 0.0001$				
	115	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$			
	117	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$		
	18	0.0001	0.0006	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$	
	31	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$	0.0144	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$
<b>5.</b>	110	0.0003				
	115	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$			
	117	$P < 0.0001$	0.35	$P < 0.0001$		
	18	0.0008	0.0694	$P < 0.0001$	0.0049	
	31	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$	0.0659	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$
<b>6.-7.</b>	110	0.0001				
	115	$P < 0.0001$	0.106			
	117	0.0251	0.0008	$P < 0.0001$		
	18	$P < 0.0001$	0.099	0.0006	$P < 0.0001$	
	31	$P < 0.0001$	0.0056	0.167	$P < 0.0001$	0.0053

### Lisa 6. Mutatsioonisageduste paarisviisiline võrdlus erinevate päevade lõikes

(esitatud on tulemused, mille  $P < 0.05$ )

Päevad 3 ja 4

	phe-lac I tüvi	P-väärtus
<b>Ühe ap mutatsioon lacI geenis</b>		
221 del A	117 vs. 105	<0.001
	117 vs. 110	<0.001
	117 vs. 115	<0.001
	117 vs. 18	<0.001
	117 vs. 31	<0.001
754 G→T	105 vs. 110	<0.001
	105 vs. 115	0.001
	105 vs. 117	<0.001
	105 vs. 18	<0.001
	105 vs. 31	<0.001
592 ins CTGG		
	105 vs. 115	<0.001
	105 vs. 31	<0.001
	110 vs. 115	<0.001

	110 vs. 31	<0.001
	115 vs. 117	<0.001
	115 vs. 18	<0.001
	117 vs. 31	<0.001
	18 vs. 31	<0.001
592 del CTGG		
	105 vs. 110	0.009
	105 vs. 115	0.001
	105 vs. 117	0.049
	105 vs. 31	<0.001
	110 vs. 115	<0.001
	110 vs. 117	<0.001
	110 vs. 31	<0.001
	115 vs. 117	0.008
	115 vs. 18	<0.001
	117 vs. 18	<0.001
	117 vs. 31	0.029
	18 vs. 31	<0.001
IS1411 insertioon		
	115 vs. 18	0.014
	115 vs. 31	0.014

#### Päev 5

	phe-lacI tüvi	P-väärtus
Operaatorala mutatsioonid		
−352 C→T	105 vs. 110	<0.001
	105 vs. 115	0.017
	105 vs. 117	<0.001
	105 vs. 18	0.016
	110 vs. 31	0.007
	117 vs. 18	0.043
	117 vs. 31	0.002
Suured deletsioonid		
300 del 10 nt	18 vs. 105	0.004
	18 vs. 110	0.010
	18 vs. 115	0.011
	18 vs. 117	0.007
	18 vs. 31	0.005
592 ins CTGG		
	105 vs. 115	<0.001
	105 vs. 31	<0.001
	110 vs. 115	<0.001
	110 vs. 31	<0.001
	115 vs. 117	<0.001
	115 vs. 18	<0.001
	117 vs. 31	<0.001
	18 vs. 31	<0.001
592 del CTGG		
	110 vs. 115	0.041
IS1411 insertioon		
	105 vs. 115	0.036

Päevad 6 ja 7

	phe-lacI tüved	P-väärtus
Operaatorala mutatsioonid		
-352 C→T	105 vs. 110	
	105 vs. 115	0.048
	105 vs. 31	0.002
	110 vs. 31	0.041
	115 vs. 117	0.046
-351 G→A	117 vs. 31	0.002
	105 vs. 110	0.026
	105 vs. 115	0.022
	105 vs. 18	0.001
	105 vs. 31	0.001
	110 vs. 117	0.031
	115 vs. 117	0.027
	117 vs. 18	0.001
	117 vs. 31	0.001
Ühe ap-sed mutatsioonid <i>lacI</i> geenis		
221 delA	117 vs. 105	<0.001
	117 vs. 110	<0.001
	117 vs. 115	<0.001
	117 vs. 18	<0.001
	117 vs. 31	<0.001
754 G→T	105 vs. 110	0.001
	105 vs. 115	0.001
	105 vs. 117	0.001
	105 vs. 18	<0.001
	105 vs. 31	<0.001
592 ins CTGG		
	105 vs. 115	<0.001
	105 vs. 31	<0.001
	110 vs. 115	<0.001
	110 vs. 31	<0.001
	115 vs. 117	<0.001
	115 vs. 18	<0.001
	117 vs. 31	<0.001
	18 vs. 31	<0.001
592 del CTGG		
	105 vs. 110	<0.001
	105 vs. 115	<0.001
	105 vs. 18	0.026
	105 vs. 31	0.011
	110 vs. 115	<0.001
	110 vs. 117	<0.001
	110 vs. 31	0.001
	115 vs. 117	0.001
	115 vs. 18	<0.001
	117 vs. 18	0.005
	117 vs. 31	0.033
	18 vs. 31	<0.001
IS1411 insertsioonid		
	105 vs. 115	0.043

105 vs. 18	0.001
105 vs. 31	<0.001
110 vs. 18	0.017
110 vs. 31	0.002
115 vs. 31	0.032
117 vs. 18	0.004
117 vs. 31	0.001

**Lisa 7. Phe<sup>+</sup> kolooniate akumulatsioon fenool-minimaaltsassidel** (tabelis on toodud erinevate päevade lõikes keskmiselt tekkinud kolooniate arv  $1 \times 10^7$  testsüsteemi sisaldava raku kohta ja sulgudes 95% usalduspiir)

phe-lacI	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>30</b>	12,86 (8,23)	16,28 (17,94)	16,77 (9,06)	36,63 (17,16)	18,53 (7,67)	3,34 (0,97)	2,96 (1,16)	3,85 (1,18)
<b>30Δ PP_4173</b>	79,85 (29,63)	17,67 (6,03)	10,61 (6,00)	44,28 (16,55)	9,31 (3,07)	8,23 (4,09)	7,73 (3,72)	6,02 (3,04)
<b>19</b>	0,21 (0,36)	7,46 (2,42)	10,95 (8,35)	23,07 (12,21)	7,35 (2,50)	4,67 (5,07)	2,60 (0,81)	4,34 (3,30)
<b>19Δ PP_4173</b>	3,59 (3,60)	10,49 (3,79)	4,32 (1,19)	18,40 (9,74)	4,13 (1,03)	1,40 (0,64)	2,60 (0,84)	2,00 (0,62)

**Lisa 8. Publikatsioon**



# Mutation Frequency and Spectrum of Mutations Vary at Different Chromosomal Positions of *Pseudomonas putida*

Triinu Juurik, Heili Ilves, Riho Teras, Tanel Ilmjärv, Kairi Tavita, Kärt Ukkivi, Annika Teppo, Katren Mikkel, Maia Kivisaar\*

Department of Genetics, Institute of Molecular and Cell Biology, Tartu University and Estonian Biocentre, Tartu, Estonia

## Abstract

It is still an open question whether mutation rate can vary across the bacterial chromosome. In this study, the occurrence of mutations within the same mutational target sequences at different chromosomal locations of *Pseudomonas putida* was monitored. For that purpose we constructed two mutation detection systems, one for monitoring the occurrence of a broad spectrum of mutations and transposition of IS element IS1411 inactivating LacI repressor, and another for detecting 1-bp deletions. Our results revealed that both the mutation frequency and the spectrum of mutations vary at different chromosomal positions. We observed higher mutation frequencies when the direction of transcription of the mutational target gene was opposite to the direction of replisome movement in the chromosome and *vice versa*, lower mutation frequency was accompanied with co-directional transcription and replication. Additionally, asymmetry of frameshift mutagenesis at homopolymeric and repetitive sequences during the leading and lagging-strand replication was found. The transposition frequency of IS1411 was also affected by the chromosomal location of the target site, which implies that regional differences in chromosomal topology may influence transposition of this mobile element. The occurrence of mutations in the *P. putida* chromosome was investigated both in growing and in stationary-phase bacteria. We found that the appearance of certain mutational hot spots is strongly affected by the chromosomal location of the mutational target sequence especially in growing bacteria. Also, artificial increasing transcription of the mutational target gene elevated the frequency of mutations in growing bacteria.

**Citation:** Juurik T, Ilves H, Teras R, Ilmjärv T, Tavita K, et al. (2012) Mutation Frequency and Spectrum of Mutations Vary at Different Chromosomal Positions of *Pseudomonas putida*. PLoS ONE 7(10): e48511. doi:10.1371/journal.pone.0048511

**Editor:** John R. Battista, Louisiana State University and A & M College, United States of America

**Received:** May 10, 2012; **Accepted:** September 25, 2012; **Published:** October 31, 2012

**Copyright:** © 2012 Juurik et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by Estonian Science Foundation grants 7376 (MK), 7019 (RT) and 7458 (HI), by funding of Targeted Financing Project SF0180031s08 to MK from Estonian Ministry of Research and Education, and by grant #55005614 to MK from the Howard Hughes Medical Institute International Research Scholars Program. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: maia.kivisaar@ut.ee

## Introduction

Mutations provide a raw material for population diversity and adaptation; therefore the mutation rate has profound effects on population diversity and evolution dynamics. Mutagenesis is a complex multi-step process involving DNA target sequences and enzymes that play roles in DNA precursor metabolism, DNA replication, recombination and repair [1]. To elucidate molecular mechanisms of mutagenesis, it is necessary to develop systems that enable detection and analysis of mutations in living cells. Hence, over the years, a number of detection systems have been developed to study mutagenesis in bacteria [2]. Some of these mutation detection systems allow to monitor mutations in plasmids whereas others in bacterial chromosome.

Occurrence of mutations in plasmids and a chromosome may differ due to distinct replication mechanisms and higher copy number of plasmids in comparison to the chromosome. For instance, ColE1 plasmids do not replicate in the same manner as the *E. coli* chromosome [3]. Also, expression of plasmid conjugal functions may facilitate mutagenic processes, as it happens in the case of the occurrence of Lac<sup>+</sup> revertants on F<sup>+</sup> plasmid in *E. coli* FC40 strain [4,5,6]. On the other hand, when studying mutagenic

processes in the bacterial chromosome, one should also consider various factors affecting DNA replication and thereby mutagenesis. A growing body of evidence have accumulated over the last years showing that replication inhibition by natural impediments such as DNA binding proteins, transcription units, unusual DNA structures and replication slow zones causes genomic instability [7]. Several other studies have addressed the effects of asymmetry of DNA replication on mutation rate [e. g., reviewed in [8]]. One DNA strand (the leading strand) is synthesized continuously, whereas the complementary strand (the lagging strand) is synthesized discontinuously in short Okazaki fragments. It has been suggested that different enzymology within the replication of two strands could provide a basis for different fidelity. For example, measurement of *lac* reversion frequencies for the two orientations in the chromosome of *E. coli* in the absence of DNA mismatch repair indicated that the lagging strand replication may be more accurate than leading strand replication [9,10]. Yet, the results of subsequent studies have been contradictory. Under the conditions of constitutive expression of the SOS system the replication of the lagging strand appeared to be the major source

of the mutations [11], whereas the following studies demonstrated lack of strand bias in UV-induced mutagenesis in *E. coli* [12].

The effect of chromosomal position on mutation rate has also been addressed in previous studies. Based on the results of comparison of synonymous substitution rates of a set of homologous genes in different bacterial species it was proposed that mutation rate depends on the distance of the target genes from the origin of replication in bacterial chromosome, being higher when genes are situated closer to the terminus [13,14]. However, experimental studies have failed to detect such effect of the distance from the origin of replication on the mutation rates when *lacZ* alleles were inserted at four sites in the *Salmonella* genome [15]. At the same time, the reversion rates of the *lacZ* alleles inserted at an intermediate locus were significantly higher than those at loci nearer to and farther from the replication origin [15]. Recently, Martina et al. [16] demonstrated that frameshift mutation rate differs at distinct chromosomal positions but no correlation between the mutation rate and the distance of the mutation site to the origin of replication was found. In contrary to the above-mentioned studies, no significant mutational bias on the occurrence of base substitutions with regard to chromosome position or leading and lagging strands of replication were found in the two sequenced genomes of 5000 generations evolved *Salmonella typhimurium* under the conditions of reduced selection and in the absence of major DNA repair systems [17]. Also, the recent analysis of the genomes of 20 commensal and pathogenic *E. coli* strains suggests that the higher mutation rates estimated near the terminus could actually be associated with a reduced efficiency of selection due to lower rates of recombination at this region [18]. Thus, some controversy between the results of experimental approaches and the analyses of whole genome DNA sequences still exists and therefore the effect of the chromosome location on the rate of mutations needs further examination.

The growth phase of bacteria may also affect mechanisms of mutagenic processes. In nature, bacteria are very often confronted with variable and stressful environments. Under such conditions bacteria grow very slowly if at all [19,20]. However, despite the reduced amount of DNA replication mutants arise that are able to take over bacterial populations. This process is known as adaptive mutagenesis, stress-induced mutagenesis or stationary-phase mutagenesis [21,22]. It has been suggested that a variety of environmental stresses induce genomic change in bacteria, generating occasional fitter mutants and potentially accelerating the evolution of bacterial populations [21,22,23,24,25,26]. Alternatively, the amplification model proposes that selection detects small improvements in growth due to a higher copy number of the selected gene; in that way mutation is made more likely because more copies of mutation target gene is added to each developing clone [27]. Despite the controversy in interpretations of the rate of mutations in stationary-phase populations the results of several studies have demonstrated that the spectrum of stationary-phase mutations is different from that occurring among the mutants of actively growing bacteria [28,29,30], indicating that distinct mechanisms are responsible for the appearance of mutations in actively growing and stationary-phase populations.

So far, *E. coli* has served as the primary model in virtually all fundamental aspects of microbiology including mutagenesis and evolution. However, recent advances in sequencing and annotation of more than a thousand of bacterial genomes have revealed that *E. coli* is rather exceptional considering its DNA polymerases and DNA repair enzymes [31,32,33,34]. For example, *E. coli* is one of the rare organisms harboring DNA polymerase Pol V genes in its chromosome [32]. At the same time, pseudomonads, one of the largest groups of bacteria including both pathogenic and non-

pathogenic species, possess some DNA polymerases and DNA repair enzymes which are widely represented in many bacteria except enterobacteria [35], thereby serving as a good model to study mutagenic processes in microorganisms distinct from *E. coli*. Unfortunately, a wide array of assay systems applicable for the detection of mutations in enterobacteria (e.g., those which are based on the activation of *lac* alleles) does not work in pseudomonads. Moreover, the test systems which have been available for the detection of mutations both in growing and stationary-phase populations of pseudomonads have enabled to monitor mutations on a plasmid [29,36].

In the present study we have constructed novel chromosomal mutation detection systems for pseudomonads. These test systems can be inserted randomly into various chromosomal sites. Using these test systems in *P. putida* we have investigated: (i) the frequency of mutations at different chromosomal sites; (ii) the effect of orientation of the target gene on mutagenic processes in the bacterial chromosome; (iii) the effect of the growth phase of bacteria on mutagenic processes in the bacterial chromosome. Our results suggest that both the mutation rate and the spectrum of mutations vary at different chromosomal positions. Also, the chromosomal location of the mutational target has a larger effect on the occurrence of mutations in growing bacteria than in stationary-phase bacteria.

## Results

### Construction of Test Systems Detecting Mutations in the *P. putida* Chromosome

So far, only plasmidial test systems have been available to study the mechanisms of the occurrence of stationary-phase mutations under carbon starvation conditions of *P. putida* and other pseudomonads [29,36]. These test systems have not been applicable for the detection of mutations in the bacterial chromosome because of too low mutation frequency. To overcome these limitations, we constructed two novel, more sensitive assay systems that allow studying mutational processes in *P. putida* chromosome both in growing and stationary-phase bacteria. Mutants able to grow on minimal medium containing phenol as only carbon and energy source (Phe<sup>+</sup> mutants) can be isolated.

The phe-lacI test system detects different types of mutations either inactivating LacI repressor or abolishing its binding sites at the *lac* operator. In this test system the phenol degradation genes *pheBA* are placed downstream of the P<sub>tac</sub> promoter, which is negatively controlled by the LacI repressor. Details for the construction of the *lacI*-P<sub>tac</sub>-*pheBA* gene cluster (the phe-lacI test system) are shown in Materials and Methods and in Table S1. The second test system, pheA+C, was constructed to monitor a single type of Phe<sup>+</sup> revertants at the fixed position of the gene *pheA*. This novel chromosomal test system is analogous to the plasmidial test system constructed by us earlier to measure reversion of a +1 frameshift mutation at a three C-nucleotides repeat flanking the inserted A nucleotide within the coding sequence of the *pheA* gene [36]. It is known that the frequency of frameshifts within nucleotides repeat is usually proportional to its length [37]. Therefore, to establish higher frequency of mutations than was achieved with the previously constructed plasmidial test system, an additional C nucleotide was introduced into a six C-nucleotides repeat at position 221 relative to the translation initiation codon of the *pheA* sequence. The frameshift mutation-containing *pheA* allele was transcribed from the constitutively expressed P<sub>gc</sub> promoter. Like the phe-lacI test system, it was inserted into the chromosome with mini-Tn5 (see Materials and Methods and Tables S1 and S2

for the construction of this test system). Initial monitoring of the appearance of Phe<sup>+</sup> revertants on phenol minimal plates containing  $1 \times 10^9$  tester cells of *P. putida* strains carrying the pheA+C test system at distinct sites in the chromosome revealed that this test system is very sensitive for the detection of chromosomal mutations. For instance, on day 6 after the plating of the tester cells thousands of Phe<sup>+</sup> colonies had emerged onto phenol minimal plates. The occurrence of the 1-bp deletion at the expected site was confirmed by the sequencing of the *pheA* gene in 8 independently isolated Phe<sup>+</sup> revertants.

### The Frequency of Mutations is Affected by the Chromosomal Location and Orientation of the Test System

To explore the occurrence of mutations in different chromosomal locations of *P. putida*, we took 21 randomly selected chromosomal insertions of the phe-lacI test system and 14 random insertions of the pheA+C test system and monitored the accumulation of Phe<sup>+</sup> mutants in these strains. The chromosomal location of the phe-lacI and pheA+C test systems in individual strains is shown in Fig. 1 and the exact insertion sites of the test system-carrying mini-Tn5 are presented in Tables S3 and S4. We plated about  $1 \times 10^7$  tester cells together with  $1 \times 10^9$  scavenger cells onto selective plates containing phenol as an only carbon source and monitored the appearance of Phe<sup>+</sup> mutant colonies in starving populations during 9 days.

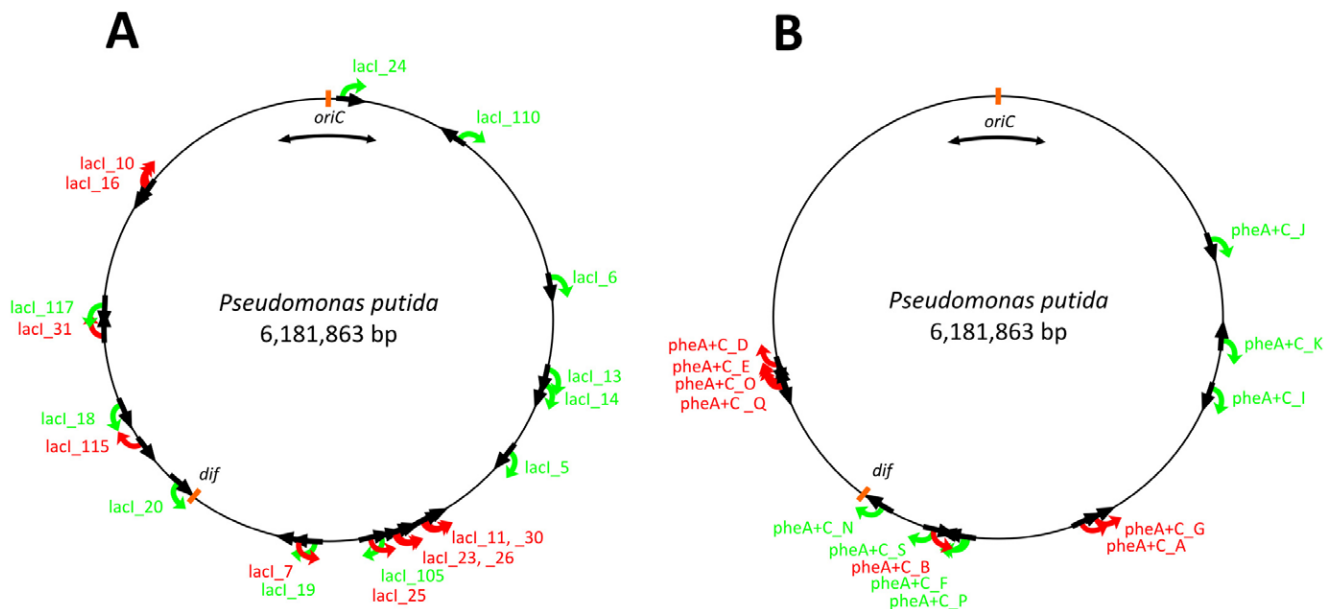
In populations carrying the phe-lacI test system in most cases the first Phe<sup>+</sup> colonies emerged onto selective plates on day 3 after the plating. Then, there was a 3-days period of rapid emergence of the mutants (Table 1). For days 8 and 9 the rate of the

accumulation of Phe<sup>+</sup> mutants significantly declined in all strains (the only exception was the strain phe-lacI\_8 with the peak on day 8).

The frequency of the accumulation of Phe<sup>+</sup> mutants onto selective plates differs in the studied strains (Table 1). Based on ANOVA with *post-hoc* Tukey HSD test, the total numbers of Phe<sup>+</sup> mutants accumulated for day 9 in the strains phe-lacI\_30, phe-lacI\_16, phe-lacI\_25, phe-lacI\_117 and phe-lacI\_115 were separated to homogeneity group distinct from that for the strains phe-lacI\_5, phe-lacI\_18, phe-lacI\_19 and phe-lacI\_20 ( $P < 0.05$ ).

The phe-lacI test system enables detection of a broad spectrum of mutations which may have dissimilar effects on the growth rate of Phe<sup>+</sup> colonies on phenol minimal plates. This complicates monitoring of dynamics of occurrence of mutations. In contrast, the pheA+C test system detects only a single type of mutations at the specific site, 1-bp deletions restoring the reading frame of the *pheA* gene. Thus, the usage of the pheA+C test system could allow better observation of changes in dynamics of occurrence of mutations in growing and carbon-starved *P. putida*. In general, it took approximately 4–6 days for first Phe<sup>+</sup> colonies to appear onto selective plates when the *P. putida* strains carrying the pheA+C test system were examined for the accumulation of Phe<sup>+</sup> mutants (Table 2). However, in the populations of the strain pheA+C\_S, the first Phe<sup>+</sup> mutants appeared on selective plates on day 11. For day 15, in average 5.7 mutants per  $1 \times 10^7$  viable cells was counted. Also, in average 12.5 mutants per  $1 \times 10^7$  cells emerged to selective plates during the days 11–15 in the populations of the strain pheA+C\_P.

In general, the rate of the accumulation of Phe<sup>+</sup> colonies declined approximately by one order of magnitude 4–5 days after



**Figure 1. Chromosomal location of the randomly inserted test system in various *P. putida* strains.** The locations of the phe-lacI test system detecting only frameshift mutations are shown in panel A (designated as lacI) and the locations of the pheA+C test system detecting only frameshift mutations are shown in panel B. The black arrows demonstrate the direction of transcription of the *P. putida* chromosomal genes containing the insertions of the test system. When the transcribed strand is the leading strand template for replication, the RNA polymerase and the replisome move in the same direction (co-directional orientation); when the transcribed strand is the lagging strand template, the RNA polymerase and the replisome converge (head-on orientations). The direction of transcription of the mutational target genes (the *lacI* gene in the phe-lacI test system and the *pheA* gene in the pheA+C test system) in different *P. putida* strains is indicated by green or red arrows. The red arrows designate head-on orientations of the transcription of the mutational target gene and the movement of the replisome in the chromosome and the green arrows point to co-directional transcription and replication. The replication of the chromosome starts at *oriC* region (indicated by two-directional arrow) and terminates at *dif* sites. Location of *P. putida dif* sequence is according to [87].

doi:10.1371/journal.pone.0048511.g001

**Table 1.** The frequency of accumulation of Phe<sup>+</sup> mutants in *P. putida* strains carrying the phe-lacI test system at different chromosomal locations<sup>a</sup>.

Strains <sup>b</sup>	HG <sup>c</sup>	Days							Total
		3	4	5	6	7	8	9	
<b>phe-lacI_30</b>	<b>(a)</b>	<b>17.12 (19.95)</b>	<b>49.00 (23.10)</b>	<b>35.84 (48.04)</b>	<b>56.28 (24.81)</b>	<b>17.04 (6.28)</b>	<b>8.41 (4.76)</b>	<b>12.67 (15.51)</b>	<b>196.35 (42.25)</b>
<b>phe-lacI_16</b>	<b>(a)</b>	<b>16.07 (9.11)</b>	<b>23.56 (16.90)</b>	<b>22.89 (15.62)</b>	<b>74.67 (48.58)</b>	<b>17.41 (11.51)</b>	<b>15.11 (8.22)</b>	<b>5.85 (4.25)</b>	<b>175.56 (87.76)</b>
<b>phe-lacI_25</b>	<b>(a)</b>	<b>4.49 (4.76)</b>	<b>103.29 (99.11)</b>	<b>11.12 (4.69)</b>	<b>34.80 (15.52)</b>	<b>9.99 (6.30)</b>	<b>3.61 (1.78)</b>	<b>2.50 (2.60)</b>	<b>169.8 (100.75)</b>
phe-lacI_117	(a)	2.75 (1.82)	36.93 (11.39)	43.13 (12.62)	50.97 (12.09)	22.89 (12.37)	4.27 (2.02)	2.44 (0.98)	163.48 (39.64)
<b>phe-lacI_11</b>	<b>(ab)</b>	<b>21.27 (47.43)</b>	<b>35.72 (26.00)</b>	<b>12.10 (10.81)</b>	<b>61.34 (43.82)</b>	<b>19.46 (12.55)</b>	<b>5.83 (2.47)</b>	<b>3.10 (4.25)</b>	<b>158.82 (94.14)</b>
<b>phe-lacI_115</b>	<b>(a)</b>	<b>0.45 (0.57)</b>	<b>63.31 (10.71)</b>	<b>17.78 (4.55)</b>	<b>30.24 (7.17)</b>	<b>17.55 (7.99)</b>	<b>5.32 (1.79)</b>	<b>1.81 (0.87)</b>	<b>136.47 (16.41)</b>
<b>phe-lacI_31</b>	<b>(ab)</b>	<b>10.91 (4.61)</b>	<b>30.25 (15.05)</b>	<b>13.79 (9.50)</b>	<b>49.71 (36.18)</b>	<b>8.98 (4.06)</b>	<b>5.79 (2.35)</b>	<b>5.91 (4.24)</b>	<b>135.23 (62.83)</b>
<b>phe-lacI_26</b>	<b>(ab)</b>	<b>14.92 (23.93)</b>	<b>43.02 (27.66)</b>	<b>13.83 (4.95)</b>	<b>36.41 (10.36)</b>	<b>11.03 (4.96)</b>	<b>2.37 (1.68)</b>	<b>6.69 (5.72)</b>	<b>128.27 (67.26)</b>
phe-lacI_12	(ab)	11.81 (11.26)	18.44 (13.36)	39.89 (33.47)	22.81 (9.43)	6.44 (6.24)	9.37 (6.77)	15.33 (9.35)	124.11 (53.01)
phe-lacI_105	(ab)	0.10 (0.23)	3.60 (3.67)	3.40 (3.62)	7.00 (6.50)	63.90 (10.73)	23.50 (4.39)	12.40 (2.64)	113.90 (18.11)
phe-lacI_110	(ab)	3.10 (1.52)	17.99 (5.10)	13.96 (5.59)	52.95 (12.06)	16.34 (6.11)	3.93 (1.67)	2.48 (1.22)	110.75 (20.45)
<b>phe-lacI_10</b>	<b>(ab)</b>	<b>10.41 (11.25)</b>	<b>19.46 (5.47)</b>	<b>10.76 (3.31)</b>	<b>53.42 (19.79)</b>	<b>7.68 (5.62)</b>	<b>4.07 (1.73)</b>	<b>4.56 (3.41)</b>	<b>110.35 (30.44)</b>
<b>phe-lacI_23</b>	<b>(ab)</b>	<b>5.2 (2.93)</b>	<b>30.08 (9.78)</b>	<b>12.17 (2.68)</b>	<b>31.81 (7.05)</b>	<b>14.41 (5.09)</b>	<b>3.38 (1.36)</b>	<b>4.59 (1.6)</b>	<b>101.88 (18.44)</b>
phe-lacI_14	(ab)	1.41 (1.25)	20.54 (10.65)	12.79 (5.39)	32.31 (21.29)	9.26 (4.92)	5.38 (4.37)	6.10 (2.91)	87.78 (37.81)
phe-lacI_6	(ab)	17.23 (22.02)	17.12 (10.72)	13.96 (7.33)	20.54 (7.69)	4.75 (2.98)	5.51 (5.10)	8.59 (3.90)	87.69 (38.41)
phe-lacI_8	(ab)	0.34 (0.78)	9.47 (9.11)	14.38 (12.49)	13.29 (12.05)	6.43 (5.25)	34.70 (35.18)	4.10 (3.27)	82.71 (35.19)
<b>phe-lacI_7</b>	<b>(ab)</b>	<b>0.74 (1.71)</b>	<b>23.65 (19.75)</b>	<b>12.40 (11.01)</b>	<b>29.62 (26.90)</b>	<b>8.78 (12.91)</b>	<b>2.48 (5.08)</b>	<b>3.33 (4.44)</b>	<b>81.01 (48.28)</b>
phe-lacI_13	(ab)	3.40 (4.56)	20.54 (9.24)	12.51 (7.60)	27.33 (16.47)	4.38 (2.80)	2.91 (1.81)	8.49 (3.82)	79.56 (26.08)
phe-lacI_24	(ab)	4.11 (1.87)	11.45 (4.56)	11.10 (5.83)	22.16 (16.85)	3.70 (3.31)	3.77 (1.56)	15.39 (16.07)	71.67 (21.86)
phe-lacI_1	(ab)	1.73 (2.85)	2.83 (2.23)	4.49 (2.28)	11.83 (4.76)	35.71 (10.04)	3.69 (2.03)	7.87 (4.07)	68.15 (13.76)
phe-lacI_5	(b)	5.23 (8.82)	9.13 (21.06)	12.27 (10.56)	14.69 (9.87)	5.12 (8.29)	3.43 (4.44)	7.34 (8.55)	57.21 (36.17)
phe-lacI_20	(b)	0.37 (0.38)	15.8 (5.60)	9.09 (3.00)	17.92 (4.4)	4.47 (1.00)	3.77 (1.92)	6.08 (2.48)	54.28 (8.73)
phe-lacI_19	(b)	0.24 (0.37)	17.13 (10.34)	6.40 (3.87)	21.21 (11.18)	3.76 (2.89)	1.49 (1.19)	2.08 (1.63)	52.29 (13.56)
phe-lacI_18	(b)	0	6.76 (2.22)	5.93 (1.74)	14.93 (3.02)	4.12 (1.44)	2 (1.06)	4.31 (2.12)	38.05 (5.91)

<sup>a</sup>Average number of Phe<sup>+</sup> mutants per day and total number of mutants calculated per  $1 \times 10^7$  cells with 95% confidence intervals are shown. The results with at least 7 (7–28) independent populations of each strain are presented.

<sup>b</sup>Strains carrying the mutational target gene opposite to the direction of the movement of replisome in the chromosome are indicated in bold. Note that location of the test system in the chromosome of the strains phe-lacI\_1, 8 and 12 has remained unknown.

<sup>c</sup>Homogeneity group.

doi:10.1371/journal.pone.0048511.t001

the appearance of first colonies (Table 2). We observed the similar reduction in the emergence of Phe<sup>+</sup> mutants in comparison to that at initial period also in this case when 10-times smaller amounts of the pheA+C tester cells were plated (data not shown). This indicated that the decline in the rate of accumulation of the 1-bp deletion mutants during the prolonged starvation was not caused by an inhibitory effect of the already existing Phe<sup>+</sup> colonies on the growth of later appearing mutant colonies. Thus, our results demonstrated that the frameshift mutations occur at higher frequency in the *P. putida* chromosome when bacteria are still growing or have been only for a short time under conditions of carbon starvation. Later, during the prolonged starvation of bacteria the frequency of these mutations is remarkably reduced.

Similarly to the results obtained with the phe-lacI test system, the frequency of the occurrence of mutations detected by the pheA+C test system was influenced by the location of the test system in the chromosome (Table 2). Based on the comparison of the total number of the Phe<sup>+</sup> mutants accumulated per  $1 \times 10^7$  cells for the day 9 it is possible to distinguish homogeneity groups with statistically significantly different mutant frequency. The strain pheA+C\_B exhibited the highest mutant frequency (group a) and the strains pheA+C\_K, pheA+C\_J and pheA+C\_P exhibited the

lowest frequency of Phe<sup>+</sup> mutants (group d). As already mentioned above, we detected the fast emergence of Phe<sup>+</sup> mutants in the strains pheA+C\_P and pheA+C\_S at later incubation period (on days 11–15). However, the total number of the Phe<sup>+</sup> mutants accumulated per  $1 \times 10^7$  for day 20 in the populations of the strains pheA+C\_P and pheA+C\_S remained statistically significantly lower than that in some other strains (e.g., in the strains pheA+C\_B, O, and G) (data not shown).

To explain the differences in the rate of accumulation of Phe<sup>+</sup> mutants in *P. putida* strains carrying the phe-lacI or pheA+C test system at distinct chromosomal sites, we examined the possibility that insertion of the test system into certain sites of the chromosome has altered the expression of genes which may influence mutation frequency in bacteria. However, based on the annotation of *P. putida* KT2440 genes at <http://www.pseudomonas.com> none of the genes which were targeted by the test system in the strains either exhibiting lower or higher Phe<sup>+</sup> mutant frequency were known to be connected with processes which could affect mutation frequency (Tables S3 and S4). Additionally, to exclude the possibility that the differences observed in the Phe<sup>+</sup> mutant frequency between individual strains could be a consequence of changes in overall mutation frequency,

**Table 2.** The frequency of accumulation of Phe<sup>+</sup> mutants in *P. putida* strains carrying the pheA+C test system at different chromosomal locations<sup>a</sup>.

Strains <sup>b</sup>	HG <sup>c</sup>	Days						Total
		4	5	6	7	8	9	
pheA+C_B	(a)	0.34 (0.55)	0.9 (1.13)	4.85 (6.10)	36.25 (27.32)	55.21 (45.51)	6.95 (8.80)	104.5 (81.14)
pheA+C_O	(b)	0	0.24 (0.60)	20.50 (11.87)	6.96 (4.50)	0.24 (0.60)	0	27.93 (15.05)
pheA+C_G	(bc)	0	0	18.58 (8.83)	4.40 (2.96)	0.9 (1.13)	0	23.87 (10.25)
pheA+C_Q	(bc)	0	0	9.03 (7.68)	9.42 (2.38)	1.04 (0.922)	0	19.48 (5.59)
pheA+C_E	(bc)	0	0	6.25 (4.57)	8.24 (4.41)	0.70 (1.24)	0.51 (0.83)	15.71 (7.55)
pheA+C_A	(bc)	0	5.96 (2.93)	8.10 (3.85)	0.53 (0.62)	0.11 (0.27)	0	14.71 (5.2)
pheA+C_D	(bc)	0	0	7.01 (3.65)	3.66 (1.5)	0.29 (0.47)	0	10.96 (3.82)
pheA+C_I	(bc)	0	2.91 (1.07)	7.71 (3.63)	0.21 (0.54)	0	0	10.83 (3.83)
pheA+C_N	(c)	0	0	0	0	8.07 (3.59)	1.71 (1.97)	9.77 (4.38)
pheA+C_F	(cd)	0	0	0	3.98 (2.49)	0.99 (0.90)	0.19 (0.48)	5.16 (3.38)
pheA+C_K	(d)	0	1.89 (1.59)	0.68 (1.17)	0	0	0	2.57 (1.97)
pheA+C_J	(d)	0	0	1.26 (0.94)	0.29 (0.48)	0	0.29 (0.48)	1.85 (1.30)
pheA+C_P	(d)	0	0	0.3 (0.77)	0	0	0	0.3 (0.77)
pheA+C_S	(d)	0	0	0	0	0	0	0

<sup>a</sup>Average numbers of Phe<sup>+</sup> mutants per day and total number of mutants for day 9 calculated per  $1 \times 10^7$  cells with 95% confidence intervals are shown. The results with at least 6 independent populations of each strain are presented.

<sup>b</sup>Strains carrying the mutational target gene opposite to the direction of the movement of replisome in the chromosome are indicated in bold.

<sup>c</sup>Based on the comparison of the frequency of Phe<sup>+</sup> mutations accumulated for day 9 statistically significantly different ( $P < 0.05$ ) homogeneity groups (a–d) appeared. doi:10.1371/journal.pone.0048511.t002

we compared the frequency of appearance Rif<sup>r</sup> mutants in the strains that exhibited statistically significantly higher or lower Phe<sup>+</sup> mutant frequency than the others. Among the strains carrying the phe-lacI test system, all strains belonging to the homogeneity groups a or b (Table 1) were examined. The strains phe-lacI\_11 and phe-lacI\_31 belonging to the homogeneity group ab were also included to this comparison. The average number of Rif<sup>r</sup> mutants per  $1 \times 10^9$  cells was similar in majority of these strains (Table S5). According to the ANOVA with *post-hoc* Tukey HSD test, statistically significant differences appeared in the frequency of Rif<sup>r</sup> mutants only in this case when the strain phe-lacI\_117 was compared with the phe-lacI strains 5, 15, 20 and 30 ( $P < 0.005$ ). However, in contrary to the reduced frequency of Rif<sup>r</sup> mutants, this strain expressed elevated frequency of Phe<sup>+</sup> mutants (Table 1). The strains phe-lacI\_105 and phe-lacI\_110 also exhibited slightly reduced frequency of Rif<sup>r</sup> mutants in comparison to the strain phe-lacI\_16 ( $P = 0.047$  and  $P = 0.039$ , respectively) but these differences could be insignificant since the  $P$ -values were close to  $\alpha$  level ( $\alpha = 0.05$ ). The frequency of Rif<sup>r</sup> mutants measured in the pheA+C test system-carrying strains (Table S6) did not differ statistically significantly or the  $P$ -value was close to  $\alpha$  level (compare Rif<sup>r</sup> mutant frequency in the strains pheA+C\_G pheA+C\_J,  $P = 0.037$ ). Taken together these results suggested that the differences in the frequency of occurrence of Phe<sup>+</sup> mutants in *P. putida* strains carrying the phe-lacI or pheA+C test system at distinct chromosomal sites are not caused by changes in overall mutation frequency. Rather, the location of the mutational target gene in the bacterial chromosome affects the frequency of occurrence of mutations in this gene.

To elucidate mechanisms which could affect the frequency of mutations at different chromosomal positions, we examined the effect of orientation of the target gene on mutagenic processes in the bacterial chromosome. Indeed, we found that the frequency of mutations was affected by the orientation of the mutational target

gene in the chromosome. The rate of the accumulation of Phe<sup>+</sup> mutants was higher when the direction of transcription of the mutational target gene (*lacI* in the phe-lacI test system or *pheA* in the pheA+C test system) was opposite to the direction of the synthesis of the leading strand in the bacterial chromosome and *vice versa*, the mutant frequency was lower when the direction of transcription of the target gene and synthesis of the leading strand were co-directional (Fig. 1 and Tables 1 and 2). At the same time, the frequency of Rif<sup>r</sup> mutants was not dependent on the orientation of the mutational target gene of the test system in the chromosome (Tables S5 and S6). We divided the studied strains into two groups according to the direction of transcription of the mutational target gene and movement of replication fork. Group one contained the strains with co-directional transcription and replication and group two the strains with head-on orientations of transcription of the target gene and movement of replisome. By using the Mann-Whitney U test we found that the frequency of Rif<sup>r</sup> mutants was similar in the two groups ( $P$  values were 0.194 and 0.081 for the phe-lacI and pheA+C strains, respectively). At the same time, the Phe<sup>+</sup> mutant frequency differed statistically significantly between the two groups for both test systems ( $P$ -values were 0.003 and 0.002 for the phe-lacI and pheA+C strains, respectively). Thus, our results indicated that the direction of transcription of the mutational target gene in respect to the replisome movement influences the rate of mutations in the chromosome of *P. putida*.

### Artificial Increase of Transcription of the Mutational Target Gene in the *P. putida* Chromosome Elevates Occurrence of Mutations in Growing Bacteria

It has been suggested that the severity of replication fork arrest due to head-on transcription correlates with the level of transcription and may cause mutations especially within highly expressed genes [38,39]. Our results support the idea that head-on



orientations of RNA polymerase and the replisome elevates mutation frequency (Table 1 and 2). In order to evaluate the effect of the level of transcription on mutation frequency in the *P. putida* chromosome, we designed an assay where the transcriptional level of the mutational target gene can be artificially changed. We modified the pheA+C test system by placing the transcription of the *pheA* allele under the control of the LacI repressor and the IPTG-inducible  $P_{lac}$  promoter (for details of the construction of the *lacI-P<sub>lac</sub>-pheA+C* cluster, see Materials and Methods and Table S1). Note that in the absence of IPTG, the *pheA* allele is transcribed in this cluster from the constitutively expressed  $P_{gc}$  promoter. Similarly to the other test systems, the obtained P<sub>lac</sub>-pheA+C test system was inserted into the chromosome of *P. putida* with mini-Tn5. We selected two random insertions of the test system with co-directional orientation of the transcription of the *pheA* allele and the movement of replisome (the strains P<sub>lac</sub>-pheA+C\_2 and P<sub>lac</sub>-pheA+C\_13) and two with head-on orientation (the strains P<sub>lac</sub>-pheA+C\_3 and P<sub>lac</sub>-pheA+C\_4) for the next studies. For exact location of the mini-Tn insertions, see Table S7.

To examine the effect of IPTG on the level of transcription of the *pheA* gene within the constructed *lacI-P<sub>lac</sub>-pheA+C* cluster, we performed Western blot analysis of the expression of the *pheA*-encoded phenol monooxygenase in cells of Phe<sup>+</sup> revertant of the strain P<sub>lac</sub>-pheA+C\_2 either grown in the presence or absence of 0.5 mM IPTG. The results presented in Fig. S2 confirmed that the level of expression of the *pheA* gene is elevated when IPTG was added into the growth medium of bacteria. However, the IPTG effects were not detectable in cells of stationary-phase bacteria which were carbon-starved for 3 days (72 hours) on agar plates (Fig. S2). Thus, the constructed test system enabled to examine the effect of artificial increase of transcription of the mutational target gene on mutation frequency in growing cells but not in starving bacteria.

To specify conditions for monitoring the occurrence of Phe<sup>+</sup> mutants in growing cultures of the tester strains, we examined how long it takes for Phe<sup>+</sup> mutant colonies to appear onto phenol minimal plates. To mimic the growth conditions used for the selection of Phe<sup>+</sup> mutants, approximately 100–200 cells of the already existing Phe<sup>+</sup> mutants were plated onto phenol minimal agar together with  $1 \times 10^9$  scavenger cells not able to grow on phenol. The Phe<sup>+</sup> colonies were only barely visible on day 7 and well-detectable on day 8 after the plating.

To study whether the level of transcription of the mutational target gene could affect mutation frequency in *P. putida* growing cultures, we cultivated the tester strains in the presence or absence of IPTG before plating onto selective medium lacking IPTG. The number of Phe<sup>+</sup> mutants appearing on selective plates on day 8 was compared. Despite the orientation of the mutational target gene *pheA* in the bacterial chromosome, we observed statistically significant increase (*post-hoc* Turkey HSD test) in the number of Phe<sup>+</sup> mutants emerged on selective plates when bacteria were pre-grown in the presence of IPTG if compared to that when bacteria were grown in the absence of IPTG ( $P < 0.001$  for the strains P<sub>lac</sub>-pheA+C\_2, 3 and 4;  $P = 0.018$  for the strain P<sub>lac</sub>-pheA+C\_13) (Fig. 2). Thus, the elevated level of transcription of the mutational target gene facilitated the frequency of mutations in growing bacteria.

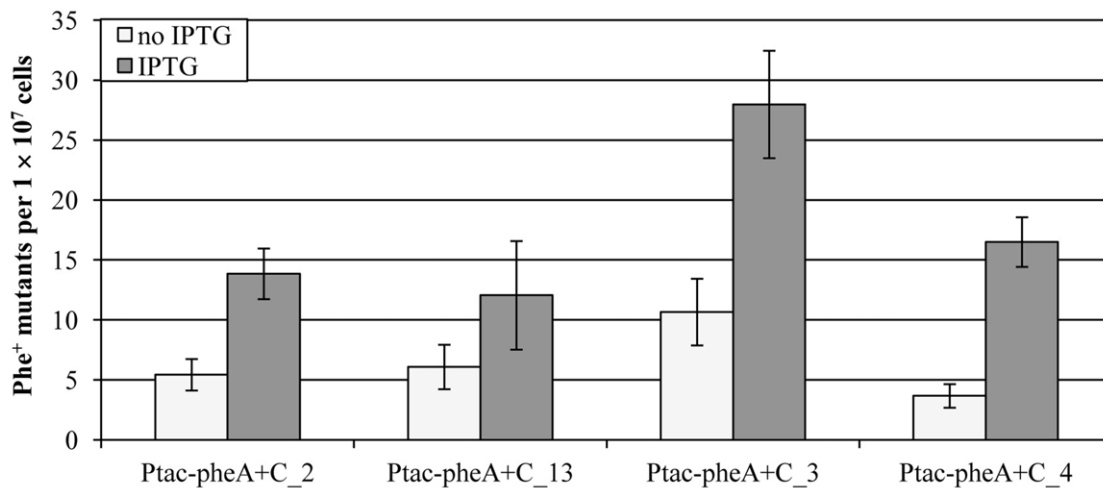
### Spectrum of LacI-inactivating Mutations is Affected by the Chromosomal Location of the Target

Since the frequency of Phe<sup>+</sup> mutations was altered at distinct chromosomal locations of the target gene, we investigated whether the frequency of occurrence of all mutations was similarly changed

at particular loci or only certain types of mutations were affected. Therefore, we analyzed the spectrum of Phe<sup>+</sup> mutations isolated in six different phe-lacI strains. Among the studied strains, phe-lacI\_18, phe-lacI\_105, phe-lacI\_110 and phe-lacI\_117 contained the mutational target gene *lacI* co-directionally and the strains phe-lacI\_31 and phe-lacI\_115 opposite to the direction of the replisome movement in the chromosome (Fig. 1A). The strains phe-lacI\_115 and phe-lacI\_117 expressed higher mutant frequency than several others, whereas the strain phe-lacI\_18 exhibited the lowest rate of accumulation of Phe<sup>+</sup> mutants among all phe-lacI test system-carrying strains characterized in this study (Table 1). We sequenced the *lacI* gene and the *lac* operator region (shown in Fig. 3) in Phe<sup>+</sup> mutants which accumulated onto selective plates on days 3–7 (Table 3).

We detected various base substitutions and single-nucleotide insertions in the *lac* operator region, and base substitutions, insertions and deletions in the *lacI* repressor gene. CTGG insertions and deletions at position 592 of the *lacI* coding sequence and C-to-T or G-to-A transitions in the *lacI* operator region at the positions –352 and –351 relative to the translation initiation codon of the *lacI* gene in the phe-lacI test system occurred the most frequently. Additionally, we detected insertions of IS element IS1411. IS1411 locates just downstream of the *pheBA* genes in the phe-lacI test system. We have previously shown that insertion of this element in proper orientation upstream of the promoterless *pheBA* genes activates transcription of these genes due to the presence of outward-directed promoters at the left end of IS1411 [40]. In the current study we detected insertions of IS1411 into the *lacI* gene resulting in inactivation of the LacI repressor.

Statistical analysis of the data using the Monte Carlo method devised by Adams and Skopek [41] established that the spectra of mutations identified in the six phe-lacI strains were different from each other (for *P* values, see the results of analysis of total spectrum in Table S8). The most significant differences appeared between the occurrence of CTGG insertions and deletions (indels) at the position 592 of the *lacI* coding sequence (see Ins CTGG and Del CTGG in Table 3 and Table S9). These differences were connected with the orientation of the *lacI* gene in the chromosome. CTGG deletions occurred at this site preferentially in the strains phe-lacI\_105, phe-lacI\_110, phe-lacI\_117 and phe-lacI\_18 which carry the mutational target gene *lacI* in the same direction as the movement of replication fork. CTGG insertions prevailed in the strains phe-lacI\_115 and phe-lacI\_31 which carry the mutational target gene in the opposite direction. Another mutational hot spot, the G-to-A transitions, was identified in the *lac* operator sequence at the position –351. The appearance of this mutation also varied depending on the chromosomal location of the test system. The –351 G-to-A transitions occurred in 30% cases among all Phe<sup>+</sup> mutations identified in the strains phe-lacI\_18 and phe-lacI\_31 but in 12–13% cases in the strains phe-lacI\_105 and phe-lacI\_117. These differences were statistically significant ( $P = 0.001$ ; Table S9). The proportion of the C-to-T transitions at the position –352 also significantly varied (e.g., compare phe-lacI\_31 versus phe-lacI\_105 and phe-lacI\_117,  $P = 0.002$ ; Table S9). Additionally, certain mutational hotspots appeared merely in one of the studied strains (Table 3). For example, the A nucleotide deletions at the position 221 was specific to the strain phe-lacI\_117, the G-to-T transversions at the position 754 were detected only in the strain phe-lacI\_105, and 10-nt deletions at the position 300 were characteristic to the strain phe-lacI\_18. These differences were also statistically significant ( $P < 0.001$ ). Thus, our results demonstrated that not only the overall frequency of mutations but also the spectrum of mutations is affected by the chromosomal location of the target sequence.



**Figure 2. Effect of transcription of mutational target gene on mutation frequency.** Influence of transcription was studied in growing bacteria. Average number of Phe<sup>+</sup> mutants accumulated per  $1 \times 10^7$  viable cells is shown with 95%-confidence intervals. To compare the frequency of Phe<sup>+</sup> mutants in growing *P. putida*, bacteria were grown in the presence or absence of 1 mM IPTG and the number of mutants emerged onto phenol minimal plates on day 8 were counted. In total, at least 30 independent cultures were examined in three parallel experiments for each strain. doi:10.1371/journal.pone.0048511.g002

The fact that the CTGG deletions prevailed in the strains which carried the mutational target gene *lacI* in the same direction as the movement of replication fork and the CTGG insertions appeared preferentially in the strains which carried the mutational target gene in the opposite direction was intriguing. To further confirm, that the orientation of the mutational target gene in the bacterial chromosome could affect the occurrence deletions and insertions, we extended our analysis of the generation of CTGG indels for additional six strains. Three strains used in this experiment carried the mutational target gene opposite to the direction of the movement of replisome and expressed the elevated frequency of Phe<sup>+</sup> mutants (the strains phe-lacI<sub>16</sub>, phe-lacI<sub>25</sub> and phe-lacI<sub>30</sub>; see Table 1). The other three strains with co-directional transcription of the target gene and movement of replisome expressing the reduced frequency of Phe<sup>+</sup> mutants (the strains phe-lacI<sub>5</sub>, phe-lacI<sub>19</sub> and phe-lacI<sub>20</sub>; Table 1) were also examined for the occurrence of CTGG indels. We found that similarly to the results obtained from our previous experiments (Table 3), the CTGG insertions prevailed in the strains carrying head-on orientation of the mutational target and the movement of the replisome (Table 4). On the other hand, the CTGG deletions prevailed in the strains phe-lacI<sub>19</sub> and phe-lacI<sub>20</sub> carrying the mutational target gene *lacI* in the same direction as the movement of replication fork (Table 4). Thus, the results obtained from the extended analysis of the occurrence of CTGG indels confirmed orientation-dependent effects on the generation of deletions or insertions in our assay.

In addition to the differences in the occurrence of point mutations and indels, the frequency of transposition of IS1411 was

affected by the chromosomal location of the target site (Table 3). We detected the insertions of IS1411 into the *lacI* gene only 4 and 2 times in the strains phe-lacI<sub>18</sub> and phe-lacI<sub>31</sub>, respectively, but 8–17 times in the other 4 strains. Statistically significant differences ( $P < 0.002$ ) appeared when the frequency of transposition in the strain phe-lacI<sub>31</sub> was compared with that in the phe-lacI strains 105, 110, 115 and 117, and in the strain phe-lacI<sub>18</sub> with that in the phe-lacI strains 105, 110 and 117 (Table S6).

### Different Types of Phe<sup>+</sup> Mutations Prevailed in Growing and Stationary-phase Bacteria

As already mentioned above, the DNA sequencing of the Phe<sup>+</sup> mutants isolated in *P. putida* strains carrying the phe-lacI test system enabled us to identify a wide array of mutations which either inactivated the LacI repressor or abolished its binding site at the operator sequence (Table 3). Since Phe<sup>+</sup> mutants continued to accumulate onto selective plates during prolonged incubation of bacteria, we supposed that in addition to Phe<sup>+</sup> mutations that occurred in growing cells, before the plating, several others occurred during the starvation of bacteria on phenol minimal plates. Additionally, time-dependent appearance of the mutants onto selective plates could be caused by dissimilar effects of individual mutations on the level of transcription of the *pheA* gene: Phe<sup>+</sup> mutants with complete inactivation of the LacI repressor could grow faster on phenol minimal plates than those with partial suppression of its functions. It was also possible that the occurrence of certain mutations is affected by physiological conditions of bacteria, i.e., some mutations arise preferentially in growing bacteria whereas some others in stationary-phase. Therefore, in



**Figure 3. The location of the P<sub>tac</sub> promoter and the LacI operator sequence in the phe-lacI test system.** –10 and –35 hexamers of the P<sub>tac</sub> promoter are boxed and the operator sequence is underlined. The nucleotide positions of the operator sequence are given from translational initiator codon GTG of the *lacI* gene. doi:10.1371/journal.pone.0048511.g003

**Table 3.** Spectrum of Phe<sup>+</sup> mutations in *P. putida* strains carrying the phe-lacI test system at various chromosomal positions.

Position <sup>b</sup>	Mutation	Number of occurrences in different phe-lacI strains <sup>a</sup>					
		105	110	115	117	18	31
–354	Del T	1 (0.709)	0	0	0	0	0
–353	Del 2 nt (TC)	1 (0.709)	0	0	1 (1.234)	0	0
–352	C → T	14 (9.927)	9 (8.381)	6 (6.746)	16 (19.74)	8 (1.951)	3 (2.622)
–352	C → G	2 (1.418)	0	0	0	0	0
–351	G → T	1 (0.709)	0	0	0	0	1 (0.874)
–351	G → A	13 (9.218)	26 (24.21)	27 (30.36)	16 (19.74)	38 (9.266)	38 (33.21)
–349	T → G	0	0	0	0	1 (0.244)	0
–349	T → C	0	0	2 (2.249)	0	0	0
–348	C → A	0	0	1 (1.124)	0	0	0
–347	A → G	0	0	1 (1.124)	0	0	0
–347	Ins A	0	1 (0.931)	0	3 (3.702)	0	0
–346	C → T	0	1 (0.931)	0	1 (1.234)	0	0
–345	Ins C	0	0	0	1 (1.234)	0	0
–3	Del 288 nt	1 (0.709)	0	0	0	0	0
13	A → G	0	0	0	0	1 (0.244)	0
22	Ins 22 nt	1 (0.709)	0	0	0	0	0
24	T → C	1 (0.709)	0	0	0	0	0
26	T → C	0	0	0	0	1 (0.244)	0
29	C → T	0	0	0	1 (1.234)	0	0
37	Del G	0	1 (0.931)	0	0	0	0
44	T → C	0	0	0	0	0	4 (3.495)
49	Del T	0	0	0	0	2 (0.488)	0
51	Ins A	0	0	0	0	2 (0.488)	0
52	Ins T	0	0	0	0	1 (0.244)	0
53	A → C	0	1 (0.931)	0	0	0	0
53	A → G	0	1 (0.931)	0	1 (1.234)	0	0
54	G → T	0	0	1 (1.124)	0	0	0
55	A → G	0	3 (2.794)	0	4 (4.935)	4 (0.975)	0
62	C → T	3 (2.127)	0	0	2 (2.468)	1 (0.244)	0
75	C → G	1 (0.709)	0	0	0	0	0
89	T → C	0	1 (0.931)	0	0	0	0
96	Ins 2 nt (CG)	0	0	0	2 (2.468)	0	0
100	Ins 10 nt	0	0	0	1 (1.234)	0	0
111	Ins 10 nt	1 (0.709)	0	0	0	3 (0.732)	0
131	G → C	1 (0.709)	0	0	0	0	0
140	A → G	0	1 (0.931)	0	0	0	1 (0.874)
141	C → G	1 (0.709)	0	0	0	0	1 (0.874)
146	C → T	1 (0.709)	0	0	0	1 (0.244)	0
149	Ins T	0	0	0	0	1 (0.244)	0
158	C → A	0	1 (0.931)	0	0	0	0
167	T → A	0	0	0	0	4 (0.975)	0
170	C → T	0	0	1 (1.124)	1 (1.234)	0	0
178	C → T	4 (2.836)	0	0	5 (6.169)	0	0
221	Del A	0	0	0	19 (23.44)	0	0
232	G → T	0	0	0	1 (1.234)	0	0
253	Del T	0	0	0	0	1 (0.244)	0
253	Del 14 nt	0	0	0	1 (1.234)	0	0
291	G → T	2 (1.418)	0	0	0	0	0



**Table 3. Cont.**

Position <sup>b</sup>	Mutation	Number of occurrences in different phe-lacI strains <sup>a</sup>					
		105	110	115	117	18	31
299	Del 149 nt	0	1 (0.931)	0	0	0	0
300	Del 10 nt	0	0	0	0	7 (1.707)	0
310	Del G	0	0	1 (1.124)	0	0	0
313	G → C	0	1 (0.931)	0	0	0	0
313	G → T	1 (0.709)	0	0	0	0	0
391	C → T	0	1 (0.931)	0	0	0	0
394	Del 66 nt	1 (0.709)	0	0	0	0	0
399	Ins C	0	0	0	1 (1.234)	0	0
403	Ins T	0	0	0	1 (1.234)	0	0
405	Ins T	1 (0.709)	0	0	0	0	0
409	Ins G	1 (0.709)	0	0	0	0	0
457	C → T	0	1 (0.931)	0	0	0	0
458	Ins C	0	0	1 (1.124)	0	0	0
460	Ins G	0	0	1 (1.124)	0	0	0
475	Ins T	0	0	0	1 (1.234)	0	0
476	Ins T	1 (0.709)	0	0	2 (2.468)	0	0
479	Ins T	1 (0.709)	0	0	0	0	0
490	Ins A	0	0	0	0	1 (0.244)	0
504	Ins G	0	0	0	0	0	3 (2.622)
541	C → T	0	0	0	0	2 (0.488)	0
552	Del G	1 (0.709)	0	0	0	0	0
592	Ins CTGG	3 (2.127)	3 (2.794)	58 (65.21)	1 (1.234)	6 (1.463)	65 (56.8)
592	Del CTGG	18 (12.76)	44 (40.98)	3 (3.373)	18 (22.21)	37 (9.022)	8 (6.991)
603	G → A	0	0	0	0	0	1 (0.874)
653	G → T	1 (0.709)	0	0	1 (1.234)	0	0
661	Ins C	1 (0.709)	0	0	1 (1.234)	0	0
669	Del G	0	0	0	1 (1.234)	1 (0.244)	0
682	C → T	0	0	0	0	1 (0.244)	0
705	Ins T	0	0	0	1 (1.234)	0	0
751	C → A	0	0	0	0	0	1 (0.874)
754	G → T	10 (7.091)	0	0	0	0	0
779	Ins 2 nt (CA)	0	0	1 (1.124)	0	0	0
780	C → A	1 (0.709)	0	0	0	0	0
858	A → C	0	0	0	1 (1.234)	0	0
916	C → T	0	2 (1.863)	0	0	0	0
983	C → T	0	0	0	1 (1.234)	0	0
IS1411		17 (12.05)	12 (11.18)	8 (8.995)	16 (19.74)	4 (0.975)	2 (1.748)
unknown		3 (2.127)	1 (0.931)	3 (3.373)	5 (6.169)	2 (0.488)	2 (1.748)
Overall mutation frequency		78	104.3	129.3	156.7	31.7	113.6
Total number analyzed		110	112	115	127	130	130

<sup>a</sup>Frequency of mutation per site calculated per total number of Phe<sup>+</sup> mutants accumulated per 1×10<sup>7</sup> cells for day 7 is shown in parentheses.

<sup>b</sup>Positions of nucleotides are given in respect to the *lacI* coding sequence so that the first translated codon GTG is at position 1–3. Mutations at positions –345 to –354 alter the *LacI* operator sequence.

doi:10.1371/journal.pone.0048511.t003

order to investigate whether the growth phase of bacteria could influence the occurrence of mutations in *P. putida* chromosome, we analyzed the spectra of mutations of Phe<sup>+</sup> mutants that emerged on the selective plates at different periods (on days 3–4, 5, and 6–7).

The spectrum of Phe<sup>+</sup> mutations after different time periods is shown in Table 5 and Table S10. The most remarkable changes appeared in the occurrence of the CTGG indels at the position 592 of the *lacI* sequence and the –351 G-to-A transitions in the *lac* operator sequence. The CTGG indels prevailed in all strains when

**Table 4.** Effect of the orientation of mutational target gene in the chromosome on occurrence of CTGG indels in *P. putida* strains carrying the phe-lacI test systems at various chromosomal positions.

Position	Mutation <sup>a</sup>	phe-lacI strains <sup>b</sup>					
		5	16	19	20	25	30
592	Ins CTGG	32	<b>35</b>	9	10	<b>39</b>	<b>35</b>
592	Del CTGG	6	<b>2</b>	26	15	<b>3</b>	<b>5</b>
Unknown		3	<b>5</b>	11	17	<b>4</b>	<b>6</b>
Total number analysed		41	<b>42</b>	46	42	<b>46</b>	<b>46</b>

<sup>a</sup>Phe<sup>+</sup> mutants accumulated on selective plates on days 3 and 4 were analysed for the occurrence of CTGG indels.

<sup>b</sup>Strains carrying the mutational target gene opposite to the direction of the movement of replisome in the chromosome are indicated in bold.

doi:10.1371/journal.pone.0048511.t004

the mutants emerged on days 3–4 were examined (Table 5). In contrary to that, the –351 G-to-A transitions were the most frequent mutations later, on days 6–7 (Table 5). It was possible that the mutations in the LacI repressor operator sequence (e.g., –351 G-to-A transitions) only partially abolished the binding of LacI to the operator. Such mutants could grow slower on phenol minimal plates than those with full inactivation of the *lacI* gene due

to the CTGG indels which changed the reading frame of the *lacI* gene. In order to examine the effects of the CTGG indels and the –351 G-to-A transitions on the growth rate of the Phe<sup>+</sup> mutants, we performed a reconstruction experiment. About 100–200 cells of the individual Phe<sup>+</sup> mutants either containing the CTGG indels or the –351 G-to-A transitions were mixed with  $1 \times 10^9$  *P. putida* scavenger cells that were not able to grow on phenol minimal medium and the mixtures were plated onto phenol minimal plates. The appearance of single Phe<sup>+</sup> colonies of these mutants, either derived from the strain phe-lacI<sub>18</sub> or phe-lacI<sub>31</sub>, was monitored. The Phe<sup>+</sup> mutant colonies which contained the CTGG indels appeared onto the phenol-containing minimal plates on day 3 after plating, whereas those which contained the –351 G-to-A transitions in the *lac* operator emerged one day later, on day 4. These results indicated that the appearance of different mutational hot spots among the mutations derived from earlier and later periods of incubation of bacteria on selective plates might be caused by dissimilar effects of these mutations for the growth of Phe<sup>+</sup> colonies on phenol minimal plates.

Although the growth rate of the Phe<sup>+</sup> colonies on the phenol minimal plates varied due to dissimilar effects of individual mutations on the transcription of the *pheA* gene from the *P<sub>lac</sub>* promoter, this was not the only reason that the mutational spectra derived from distinct time periods differed from each other. Whereas in the reconstruction experiments the colonies of the Phe<sup>+</sup> mutants with the –351 G-to-A transitions at the *lac* operator sequence became visible on selective plates already on day 4 after

**Table 5.** Time-dependent appearance of mutational hot spots in *P. putida* strains carrying the phe-lacI test system.

Days	Mutation position	pheA-lacI strains					
		105	110	115	117	18	31
3–4	–352 C→T	0	0	0	0	3	0
	–351 G→A	0	0	0	0	0	0
	221 del A	0	0	0	19	0	0
	592 ins CTGG	1	0	34	1	3	42
	592 del CTGG	12	38	2	12	30	4
	754 G→T	8	0	0	0	0	0
	Ins IS1411	0	3	5	3	0	0
	Total number	26	50	44	50	50	50
5	–352 C→T	0	9	4	11	5	2
	–351 G→A	1	0	0	1	0	0
	221 del A	0	0	0	0	0	0
	592 ins CTGG	0	1	15	0	2	15
	592 del CTGG	4	4	0	3	4	4
	754 G→T	2	0	0	0	0	0
	Ins IS1411	8	5	1	2	4	2
	Total number	32	25	24	27	30	30
6–7	–352 C→T	14	0	2	5	0	1
	–351 G→A	12	26	27	15	38	38
	221 del A	0	0	0	0	0	0
	592 ins CTGG	2	2	9	0	1	8
	592 del CTGG	2	2	1	3	3	0
	754 G→T	0	0	0	0	0	0
	Ins IS1411	9	4	2	11	0	0
	Total number	52	37	47	50	50	50

doi:10.1371/journal.pone.0048511.t005

the plating, these transitions prevailed in the late-appearing Phe<sup>+</sup> mutants that emerged onto the selective plates later, on days 6–7 (Table 5). This implied that the G-to-A transitions could occur preferentially in populations of starving bacteria, after the plating of tester cells onto phenol minimal plates. In order to further explore whether the occurrence of certain types of mutations could be dependent on physiology of bacteria, we performed statistical analysis of the mutational spectra derived from different time periods and compared these spectra in each strain separately by using the Monte Carlo method. Because the *lac* operator mutations and *lacI*-inactivating mutations had dissimilar effects on the growth of Phe<sup>+</sup> mutants on selective plates, we omitted the *lac* operator mutations from this analysis and focused only to *lacI* mutations. The Monte Carlo test revealed statistically significant differences in all strains (with the exception of the strain phe-lacI\_115) when the spectrum derived from days 3–4 was compared with the spectrum of mutations from day 5 (Table S11). The differences appeared also in this case when the spectrum of mutations from the days 3–4 was compared with that from the days 6–7 in the strains phe-lacI\_105 and phe-lacI\_117. At the same time, except for the strain phe-lacI\_105, no differences appeared when the mutational spectrum from the day 5 was compared with the spectrum from the days 6–7 (Table S11).

Importantly, statistically significant differences appeared also in this case when the spectra of mutations in different strains from the earlier time periods were compared with each other. However, differences were smaller or disappeared when the later periods were compared (Table S8 and S12). Thus, based on this analysis we suggest that more variability in the occurrence of mutations in the *P. putida* chromosome could appear at the stage of active growth of bacteria or when bacteria have spent only short period under the carbon starvation conditions.

The effect of the growth phase of bacteria on the occurrence of certain mutations can be illustrated also by two another DNA sequence alterations which inactivated the *lacI* gene. The A-nucleotide deletion at the position 221, which occurred specifically only in the strain phe-lacI\_117, was detected in Phe<sup>+</sup> colonies that emerged onto selective plates on days 3 and 4 but not later (Table 5 and Table S10). Also, the G-to-T transversions at the position 754, specific to the strain phe-lacI\_105, occurred also as the hot spot in the early-arising mutants and were not detected when the later period (days 6–7) was investigated (Table 5 and Table S10). The frequent appearance of these two mutations in the early-arisen Phe<sup>+</sup> colonies and their absence in the spectrum of mutations at the later periods indicated that these point mutations could occur preferentially in growing bacteria.

Taken together, the results of the analysis of the spectra of mutations from different time periods allowed us to draw two conclusions. First, some mutations in the *P. putida* chromosome occur preferentially in the growing cells and are rare in stationary-phase, whereas certain other mutations (e.g., –351 G-to-A transitions at the *lac* operator) prevail in stationary-phase bacteria. Secondly, the chromosomal location of the mutational target to a larger extent influences the occurrence of mutations in growing cells than in stationary-phase cells.

## Discussion

It has been known for many years that the mutation rate can vary dramatically between nucleotide sites [42]. Recent analysis of large genomic data sets of eukaryotic genomes suggests that the mutation rate can vary over many different scales, from the adjacent sites to whole chromosomes [43]. Compared to the complex organization of eukaryotic chromosomes, bacterial

chromosomes are smaller and structurally simpler. It is still an open question whether the mutation rate can vary across the bacterial chromosome. Earlier studies have suggested that the genes farther from the replication origin have higher mutation rates than those nearest to it [13,14]. Examination of the reversion rates of *lacZ* alleles inserted at four positions in the *Salmonella enterica* chromosome [15], however, did not support these findings. Nevertheless, significantly higher mutation frequency at intermediate locus than those inserted closer to replication origin or terminus appeared [15]. In contrast to the above-mentioned studies, recently published analysis of whole genome sequences suggests that there is no significant mutational bias with regard to chromosome position [17,18].

With the advent of next-generation sequencing, powerful measurements of mutation rates are now possible using whole-genome sequences of isolates either sampled from evolution experiments or derived from natural isolates of the same or related species. However, such estimates meet difficulties in distinguishing between selection and neutral processes. Our experimental approach has enabled to monitor the occurrence of mutations within the same mutational target sequence (*lacI* or *pheA*) at many different chromosomal locations. In this case the effect of selection on the fixation of mutations is the same irrespective of the chromosomal location of the target sequence. Based on the results of the comparison of the frequency of occurrence of Phe<sup>+</sup> mutations in the *P. putida* chromosome either carrying the phe-lacI or pheA+C test system at 21 and 14 positions, respectively (Table 1, Table 2) we suggest that the occurrence of mutations varies in different chromosomal loci. Comparison of the spectra of *lacI* inactivating mutations in six chromosomal positions of the phe-lacI test system revealed that these spectra were statistically significantly different from each other (Table 3, Table S7). These results altogether demonstrated that the occurrence of mutations is affected by the chromosomal location of the mutational target sequence. Several possible mechanisms may operate that can explain the differences observed in the current work.

## Effect of Head-on Transcription and Replication on Mutation Frequency

We did not notice any correlation between frequencies of mutations and distance of the studied sites from the origin of replication. Our results are in agreement with the recently published results of the comparison of rate of frameshift mutations (the assay detects loss of A•T from (A•T)<sub>8</sub> repeat in chloramphenicol acetyl transferase gene) at different positions in the *E. coli* chromosome [16]. This work also demonstrated that mutation rate varies at different positions in the genome. However, in contrast to the assay used in [16] we observed higher mutation frequency when the direction of transcription of the mutational target gene was opposite to the direction of movement of the replisome in the chromosome and *vice versa*, lower Phe<sup>+</sup> mutation frequency was accompanied with co-directional transcription and replication. This connection appeared either by testing the occurrence of the broad spectrum of mutations in *P. putida* strains carrying the phe-lacI test system in the chromosome or by monitoring one particular frameshift mutation in the range of pheA+C test system-carrying strains (Fig. 1, and Tables 1 and 2).

Several studies have indicated that co-directional transcription complexes do not impede replisome progression, whereas head-on collisions can result in replication fork arrest and may therefore induce DNA recombination and repair [44,45,46]. It has been suggested that the severity of replication fork arrest due to head-on transcription correlates with the level of expression and may cause

mutations especially within highly expressed genes [38,39]. Nevertheless, increased mutagenesis has been associated with head-on collisions also within genes that are transcribed at lower levels. For example, a recent *in vivo* study in *B. subtilis* demonstrated an increase in the *rpoB* mutation rate when the genomic region encoding the *rpoB* gene was inverted so that it was transcribed head-on to the replication [39]. Our observations on mutagenic processes taking place in *P. putida* chromosome support the idea that the head-on collisions between transcription and replication could elevate mutation frequency (Table 1 and 2). At the same time, it should be noted that the frequency of the accumulation of Phe<sup>+</sup> mutants in the strain phe-lacI117 was also elevated if compared to the several other strains, although in this case the mutational target gene (*lacI* gene) was transcribed co-directional to the replication. Also, the orientation of the mutational target gene in the chromosome had no statistically significant effect in the emergence of Phe<sup>+</sup> mutants in some other tester strains. These results imply that in addition to the effects caused by the co-directional or head-on orientations of RNA polymerase and the replisome, the rate of mutation in the distinct chromosomal sites might be affected by several other factors.

### Asymmetry in Mutagenesis during Leading and Lagging Strand Replication

The differences between the leading and lagging-strand replication have suggested that the production of mutations is not equal in the two strands. Based on the analysis of mutations in *lacZ* gene in two orientations in the *E. coli* chromosome, the lagging strand has been proposed to be less mutagenic [9]. Additionally, the base composition of DNA strands may affect the occurrence of mutations.

**(i) Frameshift mutations at homopolymeric runs.** Frameshift mutations can occur as a result of template-primer slippage at homopolymeric runs or repetitive sequences [47,48]. *In vitro* experiments with eukaryotic DNA polymerases have shown that 1-bp frameshifts occur more frequently in runs of template pyrimidines (at runs of T or C) than in runs of purines (at runs of A or G) [37]. Additionally, asymmetry of frameshift mutagenesis during the leading and lagging-strand replication has been demonstrated in comparison of reversion of various *lacZ* alleles in two orientations in the *E. coli* chromosome showing that the frequency of occurrence of 1-bp frameshift at (C·G)<sub>6</sub> run within the *lacZ* allele was higher when the template of the leading strand contained the run of pyrimidines [10]. This model could also be applied to explain the differences in mutation frequency in *P. putida* strains carrying the pheA+C test system at various chromosomal sites. The pheA+C test system measures the occurrence of 1-bp deletions at the (C·G)<sub>7</sub> run starting in the *pheA* sequence at the position 221 relative to the translational initiator codon of this gene. The coding strand of the mutated *pheA* gene contains seven C nucleotides at this site. The effect of the orientation of the mutational target gene appeared most remarkably in the comparison of the frequency of accumulation of Phe<sup>+</sup> mutations in the strains pheA+C<sub>B</sub> and pheA+C<sub>S</sub>. Specifically, these two strains contain the insertions of the test system into the same gene, *tnpS* (PP\_2981), which encodes for cointegrase of the transposon Tn4652, but in different orientations (Fig. 1B). The insertion sites are very close to each other, separated only by 108 nucleotides. In the strain pheA+C<sub>B</sub> the transcription of the mutational target gene *pheA* is opposed to the direction of the replication of the leading strand and the frequency of Phe<sup>+</sup> mutations was significantly higher than that in the strain pheA+C<sub>S</sub> in which the transcription of the *pheA* gene was co-oriented with the replication of the leading strand in the

chromosome. If the *pheA* gene is transcribed in the same direction as the replication fork movement (as it happens in the strain pheA+C<sub>S</sub>, and also in the strains pheA+C<sub>K</sub>, pheA+C<sub>J</sub> and pheA+C<sub>P</sub> expressing reduced Phe<sup>+</sup> mutation frequency in comparison with a number of others), the template for the leading strand synthesis contains the G-nucleotide run, while in the opposite direction (as it happens in the strain pheA+C<sub>B</sub>) the C-nucleotide run serves as the template. Thus, similarly to the above-mentioned studies [10,37] the higher frequency of the occurrence of Phe<sup>+</sup> revertants in the strain pheA+C<sub>B</sub> than in the strain pheA+C<sub>S</sub> and also in some other strains could be explained by preferred occurrence of 1-bp deletions when the template of the leading strand contains pyrimidines.

**(ii) Frameshift mutations at repetitive sequences.** Among the mutations which inactivated the *lacI* repressor gene in our study, the largest fraction of mutations consisted of the deletions or insertions of the 4-nucleotide sequence CTGG which is tandemly repeated three times at the positions 592 to 604 in the *lacI* gene. The hotspot mutation at this site of the *lacI* gene has been demonstrated previously in *E. coli* [49,50,51]. Note that the numbering of nucleotide positions at the *lacI* sequence in the current work differs by 29 nucleotides from that used in the previous studies in *E. coli*: in the current study the first translated codon GTG is at position 1–3 instead of position 29–31. Interestingly, among the 12 phe-lacI strains analyzed by us, the CTGG insertions prevailed in the strains containing the CTGG template in the leading strand whereas the CTGG deletions occurred predominantly in the strains containing the CTGG template in the lagging strand (Table 3 and 4). The instability of tandem repeats has been attributed to DNA polymerase slippage at misaligned intermediates in which an extrahelical loop compromised of one or more repeat units is stabilized by the surrounding correct base-pairs [48,52]. However, slippage potentiated by the CTGG repeated sequence in the *lacI* gene was supposed to be not the only misalignment that predicts the hotspot event [50].

It has been suggested that replication-dependent deletions between direct repeats occur preferentially in the lagging strand due to an unequal probability to form hairpin structures [53]. Also, the results of the another study have demonstrated that both expansions and deletions of CTG repeats occur in *E. coli* in an orientation-dependent manner [54]. In that study the deletions occurred more frequently when the CTG template was in the lagging strand whereas expansions were more prominent when the CTGs were in the leading strand template. Thus, we suggest that analogously to the mechanisms proposed for the gain and loss of CTG repeats [54] the orientation-dependent effects observed in the present study could be explained by the preferred formation of the deletion intermediates when the CTGG repeat in the *lacI* sequence is in the lagging strand template.

### Effect of Level of Transcription on Mutagenesis

There are several studies demonstrating that spontaneous mutation rate is proportional to the transcriptional level both in eukaryotic cells [55,56] and in bacteria [57,58,59,60,61]. Thus, it is possible that in addition to the effects of the orientation, the effects of the level of transcription of the mutational target gene influenced the frequency of Phe<sup>+</sup> mutations in our studies. For example, the strains pheA+C<sub>B</sub> and pheA+C<sub>S</sub> differed significantly from each other not only by the frequency of the occurrence of Phe<sup>+</sup> revertants but also by the level of the expression of the *pheA* gene. The Phe<sup>+</sup> mutants which accumulated in the strain pheA+C<sub>S</sub> grew slower than those emerged in the strain pheA+C<sub>B</sub> due to the lower cellular amount of the phenol

monooxygenase PheA (Figure S1). The reason for the level of transcription of the *pheA* gene being reduced in the strain pheA+C<sub>S</sub> is unclear. Although the direction of the transcription of the *pheA* gene opposed the direction of transcription initiated from the *tnpS* gene promoter in this strain, it is unlikely that transcription proceeding from the *tnpS* promoter could suppress transcription of the *pheA* gene. The pheA+C test system-carrying mini-transposon contains several other genes (e.g., those associated with tellurite resistance) in its other end, thereby separating the *pheA* gene from the *tnpS* promoter by a nearly 4-kb-long DNA segment.

In order to examine the possibility that the level of transcription of the mutational target gene could affect the frequency of mutations, the transcription of the mutational target gene in the pheA+C test system was placed under the control of IPTG-inducible *P<sub>lac</sub>* promoter. The increased level of transcription of the mutational target gene had statistically significant effect on the frequency of occurrence of frameshift mutations in growing bacteria (Fig. 2). Thus, we suggest that in addition to the DNA strand bias (e.g., higher frequency of mutations when the template for the lagging strand synthesis contains the G-nucleotide run) and transcription and replication collisions, changes at the level of transcription of the mutational target gene may affect mutagenic processes at least in growing cells of *P. putida*.

### Effect of Growth Phase of Bacteria on Mutagenic Processes in the Chromosome

We have monitored the occurrence of Phe<sup>+</sup> mutations in the *P. putida* chromosome both in growing and in stationary-phase bacteria. Study of the dynamics of accumulation of Phe<sup>+</sup> mutants revealed that after the initial fast period the emergence of Phe<sup>+</sup> colonies onto selective plates decreased (Table 1 and Table 2). The decline in the accumulation of Phe<sup>+</sup> mutants was more clearly visible with the pheA+C test system than that with the phe-lacI test system. The pheA+C test system scores only 1-bp deletions at the fixed position in the mutated *pheA* allele resulting in similar growth rate of Phe<sup>+</sup> revertants on phenol minimal plates. Thus, the time-dependent emergence of Phe<sup>+</sup> colonies on selective plates in *P. putida* carrying the pheA+C test system could reflect dynamics of the occurrence of mutations in the bacterial chromosome in growing and stationary-phase populations of *P. putida*. We suggest that the decline in the number of later-appearing Phe<sup>+</sup> mutants might be caused by reduced replication of the chromosome under conditions of carbon starvation of bacteria.

The results of the current study differ remarkably from that observed by us previously with the plasmidial test systems when mutations accumulated onto selective plates at constant rate or even increased in starving populations of *P. putida* [29,36,62]. In these studies we have excluded the possibility that the copy number of the plasmid could be increased in starving bacteria, thereby facilitating occurrence of stationary-phase mutations. Thus, the differences in the dynamics of occurrence of mutations in the chromosome and in plasmid during prolonged incubation of *P. putida* on selective plates are not clear yet.

The usage of the phe-lacI test system enabled the simultaneous detection of a broad spectrum of mutations (Table 3, Table 5). The CTGG indels at the position 592 in the *lacI* gene were the most frequently detected mutations when the earlier-arising Phe<sup>+</sup> colonies were investigated, whereas the −351 G-to-A transitions in the *lac* operator sequence prevailed among the late-arising Phe<sup>+</sup> mutants (Table 5, Table S10). The Phe<sup>+</sup> mutants carrying the −351 G-to-A transitions in the *lac* operator appeared in the reconstruction experiment onto phenol minimal plates one day later than those containing the CTGG indels, which demonstrates

that the *lac* operator mutants grow slower. Nevertheless, since the emergence of G-to-A transitions on selective plates in the mutagenesis assay was delayed by about 3 days in comparison with that of mutants that arose due to the CTGG indels, we suggest that the −351 G-to-A transitions occur preferentially in stationary-phase cells. The appearance of certain mutational hot spots especially in stationary-phase cells of *P. putida* has been observed also in our earlier studies when we employed plasmidial test systems for the detection of mutations [29,62]. A difference in the spectrum of mutations between stationary-phase and actively growing bacteria has been demonstrated also in *E. coli* using the FC40 system that detects reversion of the *lac* allele on F plasmid [28,29,30]. The results of the current work indicate that the occurrence of certain types of mutations preferentially in stationary-phase cells might be more general, encompassing mutagenic processes taking place also in the chromosome of *P. putida*.

Interestingly, our results imply that the occurrence of certain mutational hot spots especially in growing bacteria is affected by the chromosomal location of the mutational target sequence (Table 3 and 5 and Table S10). For example, two mutations in the *lacI* gene (the A nucleotide deletion at the position 221 and the G-to-T transversions at the position 754 of the *lacI* gene in the strains phe-lacI<sub>117</sub> and phe-lacI<sub>105</sub>, respectively) were detected only in Phe<sup>+</sup> mutants that emerged onto selective plates early, on days 3–5, but not later. The presence of strong positional effects in the occurrence of certain mutations particularly in growing cells is intriguing. In the light of the results presented in this study it is tempting to speculate that DNA replication complexes acting at different chromosomal locations in growing bacteria may contain different accessory factors which have dissimilar effects on the fidelity of DNA replication.

### Effect of DNA-binding Proteins on Mutagenesis

Nucleoid-associated proteins (NAPs) and other DNA binding proteins (e.g., various transcription factors) fold bacterial chromosome into higher-order structures and alter the level of gene expression [63,64]. Mutations can occur during the chromosome replication and as a result of DNA repair synthesis carried out at the sites of DNA damage. It is possible that regional differences in chromosomal topology may cause unequal access of chromosomal regions to mutagenesis by influencing formation of DNA repair complexes and participation of specialized DNA polymerases in DNA synthesis.

Our current results demonstrate that the frequency of transposition of IS element IS1411 also varies at different chromosomal positions of *P. putida* (Table 3). To avoid potentially deleterious effect of transposition to the host genome, the frequency of transposition in a cell is down-regulated both by transposon-encoded and host-encoded factors. Transposition may be regulated by controlling transposase TnpA expression (transcriptional, translational, and/or posttranslational control mechanisms) and also by factors that affect the transposition process itself [65]. So far, little is known about the regulation of transposition of IS1411. The results of our previous studies indicate that transposition of IS1411 occurs through a circular intermediate [40]. We suppose that the process of circle formation and transposition of this IS element is replicative, since the copy of the element has always retained at its original location. The frequency of transposition of IS1411 increases with time of starvation in *P. putida* lacking stationary-phase sigma factor RpoS, indicating that expression of some factor(s) which down regulate IS1411 transposition activity require RpoS, and that activation of IS1411 needs some late-starvation signal [62]. In the current study we have detected the

insertions of *IS1411* into the *lacI* repressor gene both in early- and late-appearing mutants (Table 4 and Table S7). However, at certain chromosomal positions (e.g., in the strains phe-lacI<sub>105</sub> and phe-lacI<sub>117</sub> which exhibited the highest frequency of *IS1411* insertions) the transposition events were mostly detected among late-appearing mutants. The fact that the frequency of transposition of *IS1411* into the *lacI* gene varies at different chromosomal positions leads us to speculate that regional differences in nucleoid folding may also influence its transposition. It is known that the level of DNA supercoiling affects some transposition reactions [66,67]. The level of DNA supercoiling is regulated by the combined activities of topoisomerases and NAPs [68]. It is well established that the superhelical density of DNA varies according to the growth conditions and that this change involves differential expression and DNA binding of NAPs [63,64,68]. Such spatio-temporal changes in DNA topology may influence transposition of *IS1411*.

## Concluding Remarks

Given the complexities of mechanisms of mutagenesis, none of the above-discussed mechanisms alone provides an explanation regarding the observed variation in the frequency of mutations at different chromosomal positions. In addition to the effects caused by the co-directional or head-on orientations of RNA polymerase and the replisome, the frequency of mutations at the distinct chromosomal sites might be affected by several other factors. In some cases (e.g., the occurrence of 1-bp deletions within the run of seven C-nucleotides and the preferred occurrence of CTGG insertions or deletions at the repeated sequence), an effect of DNA strand bias (leading or lagging strand replication) on the mutagenic processes was observed. Additionally, we cannot exclude the effect of the level of transcription. It is also noteworthy that certain mutational hot spots were detected only at particular chromosomal positions and especially in growing bacteria. Thus, it seems plausible that regional differences in chromosome structure and organization influence mutagenic processes in growing bacteria more strongly than previously assumed. At the same time, since the mutants continued to accumulate in starving populations of *P. putida*, some cells could still grow slowly and replicate their chromosome under the starvation conditions. Nevertheless, it is also possible that mutations in the chromosome of *P. putida* stationary-phase cells have mainly occurred during the course of DNA repair synthesis.

The fact that mutation frequency and spectrum of mutations vary across the bacterial chromosome could play an important role in divergence of bacterial populations in nature. Depending on the location of the potential target genes in the chromosome some mutational pathways may prevail over the others in the evolution of bacteria.

## Experimental Procedures

### Bacterial Strains, Plasmids and Media

Bacterial strains and plasmids used in this study are described in Table S1 and primers for DNA amplification in Table S2. Complete medium was Luria-Bertani (LB) medium [69], and minimal medium was M9 [70]. Solid medium contained 1.5% Difco agar. Casamino acids (CAA) and glucose were added to the minimal medium at final concentrations of 0.2% and 10 mM, respectively. Phenol minimal plates contained 2.5 mM phenol as a sole carbon and energy source. Antibiotics were added at the following final concentrations: for *E. coli*, ampicillin at 100 µg ml<sup>-1</sup>; for *P. putida*, tetracycline at 50 µg ml<sup>-1</sup>, carbenicillin at 1500 to 3000 µg ml<sup>-1</sup>, rifampicin 100 µg ml<sup>-1</sup>,

and potassium tellurite at 70 µg ml<sup>-1</sup>; for both organisms, kanamycin at 50 µg ml<sup>-1</sup>. *E. coli* was incubated at 37°C and *P. putida* at 30°C. *E. coli* and *P. putida* were electrotransformed as described by Sharma and Schimke [71]. *E. coli* strains DH5α (Invitrogen), and CC118 λpir [72] were used for the DNA cloning procedures and HB101 [73] as a host for helper plasmid pRK2013 [74], necessary for the mobilization of non-conjugative plasmids.

### Construction of Test Systems Detecting Occurrence of Mutations in *P. putida* Chromosome

The assay systems for the detection of mutations in the chromosome of *P. putida*, based on the activation of the phenol monooxygenase gene *pheA*, enable bacteria to use phenol as a sole source of carbon and energy. One of the test systems (phe-lacI) was constructed for the detection of broad spectrum of mutations either inactivating the *lacI* repressor gene or altering the *lac* operator sequence which negatively controls the transcription of the phenol monooxygenase gene *pheA* from the P<sub>lac</sub> promoter. Another test system (pheA+C) was designed for the measurement of one specific mutation, deletion of one nucleotide within a run of seven C-nucleotides leading to the reversion of the reading frame of the *pheA* gene. Both test systems were randomly inserted into the chromosome of *P. putida* strain PaW85 [75,76] within a mini-Tn5 transposon.

For the construction of the phe-lacI test system, at first the DNA fragment containing the P<sub>lac</sub> promoter and *lacI* repressor gene was cut from the plasmid pBRlacItac [77] using the restrictionase BamHI and inserted into pUC18NotKm to obtain plasmid pUC18NotlacI. The plasmid pUC18NotKm was constructed by inserting the Km-resistance gene from plasmid pUTmini-Tn5 Km2 [78] within the 1430-bp Eco47III-generated DNA fragment into the DraI-cleaved plasmid pUC18Not [72]. The restriction enzyme DraI cleaves pUC18Not three times, once at the beginning of the β-lactamase gene *bla* and twice downstream from this gene. Thus, this strategy enabled us to replace the *bla* gene sequence in pUC18Not with the Km-resistance encoding gene. The Ecl136II- and EcoRI-generated DNA fragment containing the *pheA* genes and IS element *IS1411* from the plasmid pEST1414 [29] was inserted into the Ecl136II- and EcoRI-cleaved plasmid pUC18NotlacI yielding the plasmid pUC18NotlacIpheBA. Then, pUC18NotlacIpheBA was cleaved with NotI to insert the *lacI*-P<sub>lac</sub>-*pheA* cassette from pUC18NotlacIpheBA into the NotI-cleaved mini-Tn5 delivery plasmid pJMT6 [79], resulting in the plasmid pUTlacIpheBA.

To construct the other mutation detection system pheA+C for the monitoring occurrence of 1-bp deletions, the *pheA* coding sequence was altered by inserting a single C nucleotide at position 221 relative to the translational initiator codon of this gene. The nucleotide insertion site already contained six C nucleotides. The frameshift mutation was performed by PCR amplification of the segment of the *pheA* gene from the plasmid pPU1930 [80] with primer pheABamei and the mutant primer pheAvi+1 (Table S2). The amplified DNA fragment was subcloned into the pBluescript KS(+) EcoRV site to obtain pKSpheA+C. The +1 frameshift mutation was verified by DNA sequencing. The mutated DNA fragment was thereafter inserted as XbaI- and AviII- generated fragment from pKSpheA+C into pPU1930 by replacing the original *pheA* sequence located between the XbaI and AviII sites to generate the plasmid pPUpheA+C. Thereafter, we inserted the constitutively expressed P<sub>GC</sub> promoter and the *pheA* allele with +1 frameshift as the Ecl126II- and PvuII-generated fragment from pPUpheA+C containing into the Ecl136II-cleaved pUC18NotKm to obtain

the plasmid pUC18NotpheA+C. Finally, the plasmid pUC18-NotpheA+C was cleaved with NotI to insert the  $P_{GC}$ -*pheA*+C cassette into the NotI-cleaved mini-Tn5 delivery plasmid pJMT6, yielding the plasmid pUTpheA+C.

The mutation detection system-carrying plasmids pUTlacI-pheBA and pUTpheA+C, which do not replicate in hosts other than *E. coli* strain CC118 $\lambda$ pir, were conjugatively transferred into *P. putida* strain PaW85 by using the helper plasmid pRK2013 [74]. Transconjugants carrying random insertions of the test system within mini-Tn5 in the chromosome of *P. putida* were isolated. Integration of whole delivery plasmid into *P. putida* chromosome was excluded by testing transconjugants for resistance to carbenicillin. Only those sensitive to carbenicillin represented a true transposition event. Additionally, strains either carrying the phe-lacI or pheA+C test system in the chromosome were confirmed by PCR analysis.

### Construction of Assay System for the Measurement of Effect of Transcription of the Mutation Target Gene on Mutation Frequency

To study the effect of the level of transcription of the mutation target gene on mutation frequency, we modified the pheA+C test system by placing the transcription of the mutated *pheA* allele under the control of IPTG-inducible  $P_{lac}$  promoter. At first, the Ecl136II- and PvuII-generated DNA fragment from pUPpheA+C containing the  $P_{GC}$ -*pheA*+C cassette was inserted into Ecl136II-cleaved pUC18NotlacI containing the  $P_{lac}$  promoter and *lacI* repressor gene, yielding the plasmid pUC18NotlacIpheA+C. Thereafter, pUC18NotlacIpheA+C was cleaved with NotI to insert the *lacI*- $P_{lac}$ -*pheA*+C cassette from pUC18NotlacIpheA+C into the NotI-cleaved mini-Tn5 delivery plasmid pJMT6 to obtain the plasmid pUTlacIpheA+C.

### Arbitrary PCR

To identify the location of the mutation detection system inserted randomly into *P. putida* PaW85 chromosome within mini-Tn5 in various phe-lacI and pheA+C strains, arbitrary PCR and DNA sequencing were performed. PCR products were generated by two rounds of amplifications as described elsewhere [81]. In all cases, the chromosomal location of the test system was determined twice, by identifying the mini-Tn5-flanking chromosomal DNA sequences at both sides. Such double check ensured that the insertion sites were correctly determined and demonstrated that the insertion of the mini-Tn into the chromosome did not cause genetic rearrangements at the flanking DNA. In the first round of PCR, primers ARBtel1, ARBpheA1 or pheAvaljasARB1 and arbitrary primers ARB6 or ARB-cggca were used. Second-round PCR was performed with primers ARBtel2, ARBpheA2 or pheAvaljasARB2 and arbitrary primer ARB2. DNA sequencing of the PCR products with the primers ARBtel2, ARBpheA2 or pheAvaljasARB2 was performed by using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Terminator kit. The DNA sequencing reactions were analyzed with the Applied Biosystems 3730x1 DNA sequencer.

### Comparison of Mutation Frequency in *P. putida* Strains Carrying the phe-lacI or pheA+C Test System in Different Chromosomal Locations

Conditions for the isolation of phenol-degrading Phe<sup>+</sup> mutants were the same as those described in our previous study when we isolated Phe<sup>+</sup> revertants which occurred due to point mutations [36,82]. About  $1 \times 10^7$  to  $4 \times 10^7$  cells of the tester strains derived from independent cultures that were grown overnight in liquid M9

medium containing glucose and CAA were plated onto phenol-minimal plates. Independent cultures of the *P. putida* tester strains were generated by growing cells to late logarithmic growth phase in M9 medium containing glucose and CAA, diluting this culture by  $10^5$  into fresh glucose and CAA-containing M9 medium, dispensing 2-ml aliquots into test tubes and allowing cells to reach saturation by growing cells for 18–20 h. The cells of the tester strains were mixed with approximately  $1 \times 10^9$  scavenger cells derived from the wild-type *P. putida* strain PaW85.

We have previously shown with plasmidial test systems [29,36] that Phe<sup>+</sup> colonies appearing on phenol minimal plates on day 2 contained mutations that occurred before the plating in a growing culture, whereas colonies that emerged on selective plates on day 3 and later contained mutations that occurred after the cells were plated. Latter were called stationary-phase mutations. We expected that the growth of the Phe<sup>+</sup> mutants detected with chromosomal test systems could be slower compared to that measured previously for the Phe<sup>+</sup> mutants detected with plasmidial assay systems. In order to find out how long it would take for the appearance of Phe<sup>+</sup> colonies onto selective plates in our assays (i.e., to distinguish mutations occurring in growing cultures from those occurring after plating), we carried out reconstruction experiments by mixing about 100–200 cells of individual Phe<sup>+</sup> mutants picked up from selective plates on different days (on days 4 to 7) with  $5 \times 10^8$  scavenger cells not containing the *pheA* gene and monitored the appearance of Phe<sup>+</sup> colonies on phenol minimal plates.

The frequency of Phe<sup>+</sup> mutations occurring in stationary-phase populations was determined per viable cells on the selective plates. The viability of the tester cells during incubation under long-term carbon starvation conditions was determined on the same plates that were used for the isolation of Phe<sup>+</sup> mutants. Small plugs were cut from the plates avoiding Phe<sup>+</sup> colonies. Bacteria from these plugs were suspended in M9 buffer, and dilutions were plated onto LB plates containing potassium tellurite to determine the number of colony forming units of the tester strain in starving populations. In the case of all tester strains studied, the viability of bacteria during the starvation did not decrease significantly.

The frequency of occurrence of Rif<sup>r</sup> mutations in growing cells of different *P. putida* strains was performed as previously described [83] except that the *P. putida* cultures were grown in M9 medium supplemented with glucose and CAA. Emergence of Rif<sup>r</sup> colonies was counted after 48 h of incubation to give enough time to grow up also for mutants expressing milder Rif<sup>r</sup> phenotype. The frequency of Rif<sup>r</sup> mutations was determined at least in 45 independent cultures for each *P. putida* strain. The median value for Rif<sup>r</sup> mutants per  $1 \times 10^9$  cells was calculated by using the Lea-Coulson method of the median [84].

### DNA Sequence Analysis of the Phe<sup>+</sup> mutants

To characterize the spectrum of mutations in Phe<sup>+</sup> mutants isolated with the phe-lacI test system, we PCR-amplified the *lacI* gene and the LacI operator sequence by using the primers lacopRev and lacIloppsisse1. The same primers and lacI3, lacI3out and lacIOc2 primers were used for DNA sequencing by the above-described methodology. BioEdit and ClustalW2 programs were used for sequence comparison.

### Statistical Analysis of the Results

The factorial ANOVA method and *post-hoc* Tukey HSD test were used to assess the variability of data in experiments comparing mutation frequency in different phe-lacI, pheA+C and Ptac-pheA+C strains. To obtain normal distribution, data were transformed to common logarithm, if it was necessary. To avoid taking common logarithm from zero, “1” was added for all

data. For statistical tests the significance level was set at  $P < 0.05$ . The calculations were performed using Statistica 10 software. The nonparametric Mann-Whitney U test was used for estimation of dependency of mutant frequency on the orientation of the mutational target gene. We grouped *P. putida* strains according to the direction of the target gene to the direction of movement of replisome. The group one contained the means of mutant frequency of the strains with co-directional and the group two that of the strains with head-on orientations of transcription of the target gene and movement of replisome.

The statistical significance of differences between the spectra of Phe<sup>+</sup> mutations in strains carrying the phe-lacI test system in various chromosomal locations was determined by using the hypergeometric test algorithm described in Adams and Skopek [41] and Piegorsch and Bailer [85]. The software for performing the test [86] is available at [http://www.ibiblio.org/dnam/des\\_hyhg.htm](http://www.ibiblio.org/dnam/des_hyhg.htm). All *P* values were based on 30000 iterations. A *P*-value of  $< 0.05$  means that the spectra are different in a pairwise comparison, but since 6 mutational spectra were compared, a Bonferroni correction for multiple comparisons with a corrected significance level of 0.003 ( $0.05/5 \times 6 \times 0.5$ ) should be applied. In pairwise comparison of individual sites in separate spectra the chi-square test of independence was performed by using a software program for statistical analyses (Statgraphics Centurion XV; Statpoint Inc.) and the significance level was set at  $P < 0.05$ .

## Supporting Information

**Figure S1 Western blot analysis of crude cell lysates prepared from *P. putida* strains using polyclonal anti-PheA antibodies.** Cells were grown in LB liquid medium to optical density  $A_{580} = 0.9$ . Twenty micrograms of crude cell lysates were analysed. *P. putida* strain PaW85 has been used as a negative control. (DOC)

**Figure S2 Effect of IPTG on the expression of phenol monooxygenase gene *pheA* in *P. putida* carrying the Ptac-pheA+C test system.** Western blot analysis of crude cell lysates prepared from *P. putida* strain PaW85 (negative control) and Phe<sup>+</sup> revertant of *P. putida* strain Ptac-pheA+C<sub>2</sub> by using polyclonal anti-PheA antibodies. 50 micrograms of crude cell lysates were analyzed. **A.** PheA expression in growing cultures: lane 1, size marker; lane 2, PaW85; lane 3, PaW85+ IPTG; lane 4, Ptac-pheA+C<sub>2</sub> Phe<sup>+</sup>; lane 5, Ptac-pheA+C<sub>2</sub>Phe<sup>+</sup> + IPTG. Cells were grown in M9 minimal medium in the presence of glucose and CAA. **B.** PheA expression in stationary-phase cells: lane 1, size marker; lane 2, PaW85; lane 3, PaW85+ IPTG; lanes 4 and 6, Ptac-pheA+C<sub>2</sub> Phe<sup>+</sup>; lanes 5 and 7, Ptac-pheA+C<sub>2</sub>Phe<sup>+</sup> + IPTG. Bacteria were incubated for 3 days on M9 minimal agar plates either in the presence of glucose (lanes 2–5) or in the absence of any carbon source (lanes 6 and 7). (DOC)

**Table S1 Bacterial strains and plasmids used in this study.** (DOC)

## References

1. Maki H (2002) Origins of spontaneous mutations: specificity and directionality of base-substitution, frameshift, and sequence-substitution mutageneses. *Annu Rev Genet* 36: 279–303.
2. Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RD, Schultz RA, et al. (2005) DNA repair and Mutagenesis. Second edition.: ASM Press, Washington, DC.
3. Marians KJ (1992) Prokaryotic DNA replication. *Annu Rev Biochem* 61: 673–719.

**Table S2 Oligonucleotides used in this study.** (DOC)

**Table S3 Location of the phe-lacI test system in *P. putida* PaW85 chromosome.** (DOC)

**Table S4 Location of the pheA+C test system in *P. putida* PaW85 chromosome.** (DOC)

**Table S5 The frequency of Rif<sup>r</sup> mutants in *P. putida* strains carrying the phe-lacI test system at different chromosomal locations.** (DOC)

**Table S6 The frequency of Rif<sup>r</sup> mutants in *P. putida* strains carrying the pheA+C test system on different chromosomal locations.** (DOC)

**Table S7 Location of the Ptac-pheA+C test system in *P. putida* PaW85 chromosome.** (DOC)

**Table S8 Comparison of mutational spectra in strains carrying the phe-lacI test system at different chromosomal locations.** (DOC)

**Table S9 The results of pairwise comparison of mutation frequency at individual sites obtained with chi-square test. Only the results with  $P < 0.005$  are shown.** (DOC)

**Table S10 Spectrum of Phe<sup>+</sup> mutations on separate days in *P. putida* strains carrying the phe-lacI test system in various chromosomal positions.** (DOC)

**Table S11 Comparison of mutational spectra on different time periods in strains carrying the phe-lacI test system at various chromosomal locations.** (DOC)

**Table S12 The results of pairwise comparison of mutation frequency on different time periods at individual sites obtained with chi-square test. Only the results with  $P < 0.005$  are shown.** (DOC)

## Acknowledgments

We thank Remus Th. Dame, Mariliis Tark-Dame and Signe Saumaa for their comments on this manuscript.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MK. Performed the experiments: TJ HI TI KT KU KM AT. Analyzed the data: TJ HI RT KT MK. Wrote the paper: MK RT.



6. Rodriguez C, Tompkin J, Hazel J, Foster PL (2002) Induction of a DNA nickase in the presence of its target site stimulates adaptive mutation in *Escherichia coli*. *Jô Bacteriol* 184: 5599–5608.
7. Mirkin EV, Mirkin SM (2007) Replication fork stalling at natural impediments. *Microbiol Mol Biol Rev* 71: 13–35.
8. Frank AC, Lobry JR (1999) Asymmetric substitution patterns: a review of possible underlying mutational or selective mechanisms. *Gene* 238: 65–77.
9. Fijalkowska IJ, Jonczyk P, Tkaczyk MM, Bialoskorska M, Schaaper RM (1998) Unequal fidelity of leading strand and lagging strand DNA replication on the *Escherichia coli* chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10020–10025.
10. Gawel D, Jonczyk P, Bialoskorska M, Schaaper RM, Fijalkowska IJ (2002) Asymmetry of frameshift mutagenesis during leading and lagging-strand replication in *Escherichia coli*. *Mutat Res* 501: 129–136.
11. Maliszewska-Tkaczyk M, Jonczyk P, Bialoskorska M, Schaaper RM, Fijalkowska IJ (2000) SOS mutator activity: unequal mutagenesis on leading and lagging strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12678–12683.
12. Gawel D, Maliszewska-Tkaczyk M, Jonczyk P, Schaaper RM, Fijalkowska IJ (2002) Lack of strand bias in UV-induced mutagenesis in *Escherichia coli*. *Jô Bacteriol* 184: 4449–4454.
13. Sharp PM, Shields DC, Wolfe KH, Li WH (1989) Chromosomal location and evolutionary rate variation in enterobacterial genes. *Science* 246: 808–810.
14. Mira A, Ochman H (2002) Gene location and bacterial sequence divergence. *Mol Biol Evol* 19: 1350–1358.
15. Hudson RE, Berghthorsson U, Roth JR, Ochman H (2002) Effect of chromosome location on bacterial mutation rates. *Mol Biol Evol* 19: 85–92.
16. Martina MA, Correa EM, Argarana CE, Barra JL (2012) *Escherichia coli* frameshift mutation rate depends on the chromosomal context but not on the GATC content near the mutation site. *PLoS One* 7: e33701.
17. Lind PA, Andersson DI (2008) Whole-genome mutational biases in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 17878–17883.
18. Touchon M, Hoede C, Tenaillon O, Barbe V, Baeriswyl S, et al. (2009) Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet* 5: e1000344.
19. Baath E (1998) Growth Rates of Bacterial Communities in Soils at Varying pH: A Comparison of the Thymidine and Leucine Incorporation Techniques. *Microb Ecol* 36: 316–327.
20. Poulsen LK, Licht TR, Rang C, Krogfelt KA, Molin S (1995) Physiological state of *Escherichia coli* BJ4 growing in the large intestines of streptomycin-treated mice. *Jô Bacteriol* 177: 5840–5845.
21. Foster PL (1999) Mechanisms of stationary phase mutation: a decade of adaptive mutation. *Annu Rev Genet* 33: 57–88.
22. Rosenberg SM (2001) Evolving responsively: adaptive mutation. *Nat Rev Genet* 2: 504–515.
23. Metzgar D, Wills C (2000) Evidence for the adaptive evolution of mutation rates. *Cell* 101: 581–584.
24. Tenaillon O, Taddei F, Radman M, Matic I (2001) Second-order selection in bacterial evolution: selection acting on mutation and recombination rates in the course of adaptation. *Res Microbiol* 152: 11–16.
25. Bjedov I, Tenaillon O, Gerard B, Souza V, Denamur E, et al. (2003) Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Science* 300: 1404–1409.
26. Kivisaar M (2003) Stationary phase mutagenesis: mechanisms that accelerate adaptation of microbial populations under environmental stress. *Environ Microbiol* 5: 814–827.
27. Roth JR, Kugelberg E, Reams AB, Kofoid E, Andersson DI (2006) Origin of mutations under selection: the adaptive mutation controversy. *Annu Rev Microbiol* 60: 477–501.
28. Foster PL, Trimarchi JM (1994) Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli* by simple base deletions in homopolymeric runs. *Science* 265: 407–409.
29. Kasak L, Hörak R, Kivisaar M (1997) Promoter-creating mutations in *Pseudomonas putida*: a model system for the study of mutation in starving bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3134–3139.
30. Rosenberg SM, Longerich S, Gee P, Harris RS (1994) Adaptive mutation by deletions in small mononucleotide repeats. *Science* 265: 405–407.
31. Ambur OH, Davidsen T, Frye SA, Balasingham SV, Lagesen K, et al. (2009) Genome dynamics in major bacterial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 33: 453–470.
32. Erill I, Campoy S, Mazon G, Barbe J (2006) Dispersal and regulation of an adaptive mutagenesis cassette in the bacteria domain. *Nucleic Acids Res* 34: 66–77.
33. Goosen N, Moolenaar GF (2008) Repair of UV damage in bacteria. *DNA Repair (Amst)* 7: 353–379.
34. Shuman S, Glickman MS (2007) Bacterial DNA repair by non-homologous end joining. *Nat Rev Microbiol* 5: 852–861.
35. Kivisaar M (2010) Mechanisms of stationary-phase mutagenesis in bacteria: mutational processes in pseudomonads. *FEMS Microbiol Lett* 312: 1–14.
36. Tegova R, Tover A, Tarassova K, Tark M, Kivisaar M (2004) Involvement of error-prone DNA polymerase IV in stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. *Jô Bacteriol* 186: 2735–2744.
37. Kunkel TA (1986) Frameshift mutagenesis by eucaryotic DNA polymerases *in vitro*. *Jô Biol Chem* 261: 13581–13587.
38. Pomerantz RT, O'Donnell M (2010) What happens when replication and transcription complexes collide? *Cell Cycle* 9: 2537–2543.
39. Srivatsan A, Tehranchi A, MacAlpine DM, Wang JD (2010) Co-orientation of replication and transcription preserves genome integrity. *PLoS Genet* 6: e1000810.
40. Kallastu A, Horak R, Kivisaar M (1998) Identification and characterization of IS1411, a new insertion sequence which causes transcriptional activation of the phenol degradation genes in *Pseudomonas putida*. *Jô Bacteriol* 180: 5306–5312.
41. Adams WT, Skopek TR (1987) Statistical test for the comparison of samples from mutational spectra. *Jô Mol Biol* 194: 391–396.
42. Benzer S (1961) On the Topography of the Genetic Fine Structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 47: 403–415.
43. Hodgkinson A, Eyre-Walker A (2011) Variation in the mutation rate across mammalian genomes. *Nat Rev Genet* 12: 756–766.
44. Pomerantz RT, O'Donnell M (2008) The replisome uses mRNA as a primer after colliding with RNA polymerase. *Nature* 456: 762–766.
45. Mirkin EV, Mirkin SM (2005) Mechanisms of transcription-replication collisions in bacteria. *Mol Cell Biol* 25: 888–895.
46. Rudolph CJ, Dhillon P, Moore T, Lloyd RG (2007) Avoiding and resolving conflicts between DNA replication and transcription. *DNA Repair (Amst)* 6: 981–993.
47. Kunkel TA, Bebenek K (2000) DNA replication fidelity. *Annu Rev Biochem* 69: 497–529.
48. Streisinger G, Okada Y, Emrich J, Newton J, Tsugita A, et al. (1966) Frameshift mutations and the genetic code. This paper is dedicated to Professor Theodosius Dobzhansky on the occasion of his 66th birthday. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 31: 77–84.
49. Farabaugh PJ (1978) Sequence of the *lacI* gene. *Nature* 274: 765–769.
50. Schaaper RM, Danforth BN, Glickman BW (1986) Mechanisms of spontaneous mutagenesis: an analysis of the spectrum of spontaneous mutation in the *Escherichia coli lacI* gene. *Jô Mol Biol* 189: 273–284.
51. Bharatan SM, Reddy M, Gowrishankar J (2004) Distinct signatures for mutator sensitivity of *lacZ* reversions and for the spectrum of *lacI/lacO* forward mutations on the chromosome of nondividing *Escherichia coli*. *Genetics* 166: 681–692.
52. Streisinger G, Owen J (1985) Mechanisms of spontaneous and induced frameshift mutation in bacteriophage T4. *Genetics* 109: 633–659.
53. Trinh TQ, Sinden RR (1991) Preferential DNA secondary structure mutagenesis in the lagging strand of replication in *E. coli*. *Nature* 352: 544–547.
54. Kang S, Jaworski A, Ohshima K, Wells RD (1995) Expansion and deletion of C/TG repeats from human disease genes are determined by the direction of replication in *E. coli*. *Nat Genet* 10: 213–218.
55. Kim N, Abdulovic AL, Gealy R, Lippert MJ, Jinks-Robertson S (2007) Transcription-associated mutagenesis in yeast is directly proportional to the level of gene expression and influenced by the direction of DNA replication. *DNA Repair (Amst)* 6: 1285–1296.
56. Aguilera A, Gomez-Gonzalez B (2008) Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet* 9: 204–217.
57. Beletskii A, Bhagwat AS (1996) Transcription-induced mutations: increase in C to T mutations in the nontranscribed strand during transcription in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13919–13924.
58. Reimers JM, Schmidt KH, Longacre A, Reschke DK, Wright BE (2004) Increased transcription rates correlate with increased reversion rates in *leuB* and *argH* *Escherichia coli* auxotrophs. *Microbiology* 150: 1457–1466.
59. Fix D, Canugovi C, Bhagwat AS (2008) Transcription increases methylmethane sulfonate-induced mutations in *alkB* strains of *Escherichia coli*. *DNA Repair (Amst)* 7: 1289–1297.
60. Pybus C, Pedraza-Reyes M, Ross CA, Martin H, Ona K, et al. (2010) Transcription-associated mutation in *Bacillus subtilis* cells under stress. *Jô Bacteriol* 192: 3321–3328.
61. Wright BE (2004) Stress-directed adaptive mutations and evolution. *Mol Microbiol* 52: 643–650.
62. Saumaa S, Tover A, Kasak L, Kivisaar M (2002) Different spectra of stationary-phase mutations in early-arising versus late-arising mutants of *Pseudomonas putida*: involvement of the DNA repair enzyme MutY and the stationary-phase sigma factor RpoS. *Jô Bacteriol* 184: 6957–6965.
63. Dillon SC, Dorman CJ (2010) Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat Rev Microbiol* 8: 185–195.
64. Dame RT (2005) The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin. *Mol Microbiol* 56: 858–870.
65. Nagy Z, Chandler M (2004) Regulation of transposition in bacteria. *Res Microbiol* 155: 387–398.
66. Isberg RR, Syvanen M (1982) DNA gyrase is a host factor required for transposition of Tn5. *Cell* 30: 9–18.
67. Pato ML, Banerjee M (1996) The Mu strong gyrase-binding site promotes efficient synapsis of the prophage termini. *Mol Microbiol* 22: 283–292.
68. Travers A, Muskhelishvili G (2005) DNA supercoiling - a global transcriptional regulator for enterobacterial growth? *Nat Rev Microbiol* 3: 157–169.
69. Miller JH (1992) A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.
70. Adams MH (1959) Bacteriophages: Interscience Publishers Inc., NY.
71. Sharma RC, Schimke RT (1996) Preparation of electrocompetent *E. coli* using salt-free growth medium. *Biotechniques* 20: 42–44.
72. Herrero M, de Lorenzo V, Timmis KN (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal

- insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *Jô Bacteriol* 172: 6557–6567.
73. Boyer HW, Roulland-Dussoix D (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *Jô Mol Biol* 41: 459–472.
  74. Figurski DH, Helinski DR (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 1648–1652.
  75. Bayley SA, Duggleby CJ, Worsey MJ, Williams PA, Hardy KG, et al. (1977) Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2. *Mol Gen Genet* 154: 203–204.
  76. Regenhardt D, Heuer H, Heim S, Fernandez DU, Strompl C, et al. (2002) Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440. *Environ Microbiol* 4: 912–915.
  77. Ojangu EL, Tover A, Teras R, Kivisaar M (2000) Effects of combination of different -10 hexamers and downstream sequences on stationary-phase-specific sigma factor sigma(S)-dependent transcription in *Pseudomonas putida*. *Jô Bacteriol* 182: 6707–6713.
  78. de Lorenzo V, Herrero M, Jakubzik U, Timmis KN (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *Jô Bacteriol* 172: 6568–6572.
  79. Sanchez-Romero JM, Diaz-Orejas R, De Lorenzo V (1998) Resistance to tellurite as a selection marker for genetic manipulations of *Pseudomonas* strains. *Appl Environ Microbiol* 64: 4040–4046.
  80. Nurk A, Kasak L, Kivisaar M (1991) Sequence of the gene (*pheA*) encoding phenol monooxygenase from *Pseudomonas* sp. EST1001: expression in *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *Gene* 102: 13–18.
  81. O'Toole GA, Kolter R (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 28: 449–461.
  82. Saumaa S, Tover A, Tark M, Tegova R, Kivisaar M (2007) Oxidative DNA damage defense systems in avoidance of stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. *Jô Bacteriol* 189: 5504–5514.
  83. Jatsenko T, Tover A, Tegova R, Kivisaar M (2010) Molecular characterization of Rif(r) mutations in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *Mutat Res* 683: 106–114.
  84. Rosche WA, Foster PL (2000) Determining mutation rates in bacterial populations. *Methods* 20: 4–17.
  85. Piegorsch WW, Bailer AJ (1994) Statistical approaches for analyzing mutational spectra: some recommendations for categorical data. *Genetics* 136: 403–416.
  86. Cariello NF, Piegorsch WW, Adams WT, Skopek TR (1994) Computer program for the analysis of mutational spectra: application to p53 mutations. *Carcinogenesis* 15: 2281–2285.
  87. Carnoy C, Roten CA (2009) The *diff/Xer* recombination systems in proteobacteria. *PLoS One* 4: e6531.

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina Tanel Ilmjärv  
(*autori nimi*)

(sünnikuupäev: 23.04.1988)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

***Pseudomonas putida* mutatsiooniprotsesside sõltuvus kromosomaalsest lokalisatsioonist  
ja rakkudevahelisest kommunikatsioonist**

(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendajad on Maia Kivisaar ja Heili Ilves,  
(*juhendaja nimi*)

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2013 (*kuupäev*)